

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition (PATOGEN)

Présentée et soutenue par :

EL MAHGUBI Anwar

le : lundi 8 avril 2013

Titre :

MODULATION DE LA TOXINOGENESE FONGIQUE
PAR DES EXTRAITS NATURELS

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

UMR INRA-INPT-UPS 1331 TOXALIM, Equipe Immuno-Mycotoxicologie

Directeur(s) de Thèse :

BAILLY Jean-Denis

Rapporteurs :

BARBIER Georges

BOIRON Patrick

Membre(s) du jury :

MATHIEU Florence

FROMENT Alain

PUEL Olivier

A ma mère

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur de cette thèse, **Jean-Denis Bailly**, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je lui suis également reconnaissant pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, pour ses qualités pédagogiques et scientifiques, pour sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

Je tiens à adresser mes remerciements à **Isabelle Oswald**, Directrice de l'équipe Immuno-Mycotoxicologie pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à madame le professeur **Florence Mathieu**, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de thèse de doctorat.

Je remercie très sincèrement monsieur le professeur **Patrick Boiron** et monsieur le professeur **Georges Barbier** d'avoir accepté d'être rapporteurs ma thèse.

Je remercie également **Alain Froment** et **Olivier Puel** d'avoir accepté d'examiner ma thèse.

Je tiens à remercier **Sylviane Bailly** d'avoir pris le temps de m'expliquer et de me présenter toutes les moisissures qui pouvaient exister, d'avoir pris le temps de trouver la solution à certaines manipulations et de m'avoir écouté.

Je remercie également **Arlette** et **Marie-Rose** pour leur accueil chaleureux ainsi que pour le temps qu'elles ont pris pour m'expliquer tout ce que je devais savoir sur le laboratoire.

Je tiens à remercier toute l'équipe 5 de Toxalim et toutes les personnes avec qui j'ai partagé des bons moments et qui ont rendu plus agréable mon séjour au sein de cette équipe.

Je remercie le Centre de recherche de biotechnologie de Libye et son directeur, en particulièrement **Mohamed Sharif** et l'UNESCO.

Je remercie ma belle-mère et mon père pour les efforts et les sacrifices faits pour que je puisse réaliser mes rêves et surtout ma femme qui m'a énormément aidé et pour son soutien au cours de ces trois années.

Pour les moments extraordinaires passés ensemble je tiens à remercier mes amis : **Imad, Aeimen, Abdulraouf, Hamza, Salem et Riad.**

A tous ce que j'ai oubliés, mais qui se reconnaîtront ici.

Résumé

Les aflatoxines sont des mycotoxines contaminants de nombreuses matières premières, particulièrement en région tropicale et sub-tropicale où les conditions climatiques sont très favorables à leur synthèse. Dans cette famille de contaminant, l'aflatoxine B1 est le composé le plus important car cancérogène chez l'homme et l'animal.

L'objectif général de ce travail est de développer une nouvelle stratégie de lutte contre ces mycotoxines en identifiant des composés d'origine naturelle capables d'inhiber spécifiquement la synthèse de ces toxines.

Dans un premier temps, notre travail a visé à identifier des composés d'intérêt. Pour cela, nous avons réalisé l'analyse de la contamination fongique et mycotoxique d'épices commercialisées au Maroc. Ce travail a permis d'identifier des substrats d'intérêt. En effet, certaines épices se caractérisent par la présence fréquente de souches toxigènes d'*Aspergillus* de la section *Flavi* mais ne sont cependant que très rarement contaminées par les aflatoxines.

Dans une seconde partie, nous avons démontré que des extraits aqueux préparés à partir de ces épices étaient effectivement capables d'inhiber de façon dose-dépendante la synthèse de l'aflatoxine B1 par une souche toxigène d'*Aspergillus flavus*. Cet effet a aussi été observé sur la synthèse des autres aflatoxines et dans toutes les espèces fongiques de la section *Flavi* capables de produire ces composés. Les premiers essais visant à identifier le mécanisme d'action semblent montrer que cette inhibition n'est pas liée à une modulation du stress oxydant.

Mots clés : mycotoxines, aflatoxines, inhibition, extraits naturels, *Aspergillus*

Abstract

Aflatoxins are mycotoxins that may contaminate many commodities, especially in tropical and sub-tropical region, where the climatic conditions are very favourable for their synthesis. Aflatoxin B1 is the most important member of this family of compounds, due to its carcinogenic properties in both humans and animals.

The general objective of this work is to develop a new strategy to prevent mycotoxin contamination based on the identification of natural compounds able to specifically down modulated toxin synthesis pathway.

As a first step, our work aimed to identify compounds of interest. For that we studied fungal and mycotoxin contamination of spices marketed in Morocco. The results obtained demonstrated that some spices were frequently contaminated with toxigenic isolates of *Aspergillus* (section *Flavi*) but rarely contaminated with aflatoxins.

In a second part, we demonstrated that aqueous extracts made from these spices were able to inhibit in a dose-dependant manner aflatoxin B1 synthesis by a toxigenic strain of *Aspergillus flavus*. This effect was also observed on the production of other aflatoxins and in all species of the *Flavi* section able to produce these toxins. The first assays aiming to identify the mechanism of action seem to show that this inhibition is not linked to oxidative stress.

Key words : mycotoxins, aflatoxins, inhibition, natural extracts, *Aspergillus*

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFB1	Aflatoxine B1
AFB2	Aflatoxine B2
AFG1	Aflatoxine G1
AFG2	Aflatoxine G2
AFM1	Aflatoxine M1
AFM2	Aflatoxine M2
ACP	Acide cyclopiazonique
ARN	Acide ribonucléique
BSA	Albumine sérique bovine
CAT	Catalase
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
DTNB	Acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
EFSA	Autorité Européenne De Sécurité Des Aliments
FAO	Food and Agriculture Organization
GSH	Glutathion réduit
HPLC	Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance
CIRC	Centre International Recherche Cancer
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NOR	Acide Norsolonique
PDMAB	Paradiméthylaminobenzaldehyde
SOD	Superoxyde dismutase
STG	Stérigmatocystine
TNB	Acide 5-thio-2-nitrobenzoïque
V.	Volume
YES	Yeast Extract-Sucrose

Liste des tableaux

Tableau 1:	Principales mycotoxines, moisissures toxinogènes et principaux substrats concernés	6
Tableau 2:	Toxicités des principales mycotoxines et mécanisme d'action	7
Tableau 3:	Réglementation européenne en vigueur concernant les teneurs en mycotoxines dans les denrées alimentaires destinées à l'homme	9
Tableau 4:	Réglementations européennes en vigueur concernant les teneurs en aflatoxines dans les denrées alimentaires destinées à l'homme	9
Tableau 5:	Principales espèces d' <i>Aspergillus</i> de la section <i>Flavi</i> productrices d'aflatoxines	18
Tableau 6:	Influence de la température sur la croissance d' <i>A.flavus</i> et la production d'aflatoxine G1 à 10J de culture sur milieu au malt liquide	21
Tableau 7:	Influence du couple hydro-thermique sur la production d'aflatoxine B1 sur milieu Yes agar	22
Tableau 8:	DL50 de l'AFB1 dans d'autres espèces animales	31
Tableau 9:	Toxicité chronique de l'AFB1. Tableau clinique chez quelques espèces animales.	33
Tableau 10:	Effet-dose de l'AFB1 sur la croissance des enfants	35
Tableau 11:	Présence des aflatoxines dans les céréales et les produits à base de céréales	37
Tableau 12:	Présence des aflatoxines dans les fruits à coque, fruits secs, graines de cucurbitacées	38
Tableau 13:	Présence des aflatoxines dans les épices	40
Tableau 14:	Présence de l'aflatoxine M1 dans le lait et les produits laitiers	42
Tableau 15:	Effet de souche atoxinogène sur la réduction de la contamination par les aflatoxines	47
Tableau 16:	Molécules inhibant la synthèse d'AFB1 par modification de l'environnement ou interférant avec la régulation de la voie de biosynthèse	53
Tableau 17:	Molécules inhibant des enzymes de la voie de biosynthèse	54
Tableau 18:	Molécules inhibant la synthèse d'aflatoxine dont le mécanisme d'action n'est pas connu	54
Tableau 19:	Caractérisation des souches d' <i>Aspergillus flavus</i> après 8 jours de culture sur milieu MEA	70
Tableau 20:	Espèce d' <i>Aspergillus</i> de la section <i>Flavi</i> utilisées dans l'étude	71
Tableau 21:	Teneur en ergostérol, protéines et nombre des spores après culture d' <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 62477 pendant 8 jours en présence de concentrations croissantes d'extrait de poivre.	80
Tableau 22:	Impact d'extraits aqueux de poivre noir à 0,5% sur la croissance et la synthèse d'AFB1 dans différentes souches d' <i>Aspergillus flavus</i>	81
Tableau 23:	Impact d'extraits aqueux de poivre sur la croissance et la synthèse d'AFB1 sur plusieurs espèces d' <i>Aspergillus</i> de la section <i>Flavi</i>	82
Tableau 24:	Impact d'extraits aqueux de poivre sur la synthèse d'AFB2 et AFG1 par plusieurs espèces d' <i>Aspergillus</i> de la section <i>Flavi</i>	84
Tableau 25:	Impact d'extraits aqueux de poivre sur la croissance fongique après 8 jours d'incubation	88

Liste des figures

Figure 1:	Ligne du temps des événements clés concernant la découverte des aflatoxines et leur mécanisme d'action	11
Figure 2:	Structures chimiques et formules brutes des principales aflatoxines	13
Figure 3:	Structure morphologique du genre <i>Aspergillus</i>	14
Figure 4:	<i>Aspergillus flavus</i>	15
Figure 5:	<i>Aspergillus parasiticus</i>	16
Figure 6:	<i>Aspergillus nomius</i>	17
Figure 7:	Prévalence des aflatoxines en fonction des régions	23
Figure 8:	Cluster de gènes (A) et voie de biosynthèse des aflatoxines (B).	25
Figure 9:	Régulation d' <i>aflR</i> et d' <i>aflS</i> dans la voie de biosynthèse des aflatoxines	27
Figure 10:	Biotransformation hépatique de l'AFB1	28
Figure 11:	Interaction de l'AFB1-8,9 époxyde avec les constituants cellulaires	29
Figure 12:	Répartition géographique des carcinomes hépatocellulaires attribuables à l'aflatoxine B1	34
Figure 13:	Concentration des adduits sériques AFB1-Albumine en fonction des groupes d'enfants et de leur score Z	35
Figure 14:	Détoxification de l'AFB1 par ammoniation	49
Figure 15:	<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	65
Figure 16:	Chromatographie flash des extraits aqueux de poivre. Obtention de 10 fractions	77
Figure 17:	Production d'AFB1 par <i>Aspergillus flavus</i> , NRRL 62477 en fonction de la concentration en extrait de poivre après 8 jours d'incubation.	78
Figure 18:	Croissance mycélienne de la souche d' <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 62477 cultivée en présence de concentrations croissantes d'extrait de poivre	79
Figure 19:	Effet des extraits aqueux de poivre sur l'aspect des colonies d' <i>A.flavus</i> NRRL 62477 après 4J de culture à 27°C	80
Figure 20:	Impact de concentrations croissantes d'extrait de poivre noir sur la production d'AFB1 par la souche d' <i>A. minisclerotigenes</i> E44.	83
Figure 21:	Activité de la SOD de la souche d' <i>Aspergillus flavus</i> après 8 jours d'incubation en présence de concentrations croissantes d'extrait de poivre.	85
Figure 22:	Activité de la Catalase (figure A) et quantité du glutathion (GSH) (figure B) après 8 jours de culture de la souche d' <i>Aspergillus flavus</i> en présence de concentrations croissantes d'extrait de poivre.	86
Figure 23:	Impact des extraits de poivre noir sur la production de NOR par la souche mutante d' <i>A. parasiticus</i> NRRL 6111	87
Figure 24:	Impact de concentrations croissantes d'extrait de poivre sur la production de stérigmatocystine après 8 jours d'incubation	88
Figure 25:	Production d'acide cyclopiazonique (ACP) par une souche d' <i>A.flavus</i> NRRL 62477 après 8 jours d'incubation en fonction de la concentration en extrait de poivre.	89
Figure 26:	Production d'aflatoxine B1 (% par rapport au Témoin) par la souche d' <i>A. flavus</i> NRRL 62477 en fonction de la quantité de pipérine après 8 jours d'incubation.	91
Figure 27:	Production d'aflatoxine B1 (% par rapport au Témoin) par la souche d' <i>A. flavus</i> NRRL 62477 en fonction de la quantité de pipérine après 4 jours d'incubation.	92
Figure 28:	nombre de spores après culture de la souche d' <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 62477 pendant 8 jours en présence de différentes quantités de pipérine.	92
Figure 29 :	production d'AFB1 par la souche NRRL 62477 d' <i>A.flavus</i> en présence de 2% de PN et des différentes fractions après 8 jours d'incubation.	93

Figure 30 :	Diamètre des colonies de la souche d' <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 62477 après 8 jours de cultures en absence (T) ou en présence des dix fractions obtenues à partir des extraits aqueux de poivre	94
Figure 31 :	Chromatogrammes des fractions F8 (A) et F5 (B)	94

Table des matières

<u>Introduction générale</u>	1
<u>Première partie : données bibliographiques</u>	3
1. Les mycotoxines : données générales	4
1.1. Définition	4
1.2. Contamination des denrées alimentaires	4
1.3. Toxicité	6
1.4. Réglementation	7
2. Les aflatoxines	11
2.1. Historique	11
2.2. Structure chimique et caractéristiques biochimiques	12
2.3. Biosynthèse des aflatoxines	13
2.3.1. Principales espèces productrices d'aflatoxines	13
2.3.2. Conditions de développement et de toxinogénèse	20
2.3.3. Voie de biosynthèse et régulation	23
2.4. Métabolisme et Toxicité	27
2.4.1. Métabolisme	27
2.4.2. Mécanisme d'action cellulaire	28
2.4.3. Toxicité	29
2.5. Contamination des aliments	36
2.5.1. Produits végétaux	36
2.5.2. Denrées animales et d'origines animales	41
2.6. Stratégies de lutte contre les aflatoxines	43
2.6.1. En amont : Amélioration des pratiques agricoles	43
2.6.2. Action pendant le développement fongique	44
2.6.3. En aval : décontamination des matières premières	47
2.6.4. Stratégie alternative de lutte contre l'AFB1 par modulation négative de la synthèse	52
3. Conclusion	55
<u>Seconde partie : qualité fongique et mycotoxique d'épices commercialisées au Maroc</u>	56
1. Introduction - Contexte de l'étude	57
2. Article El Mahgubi <i>et al.</i> , Food Control, 32, 143-148, 2013.	58
3. Conclusion	65
<u>Troisième partie : impact d'extraits aqueux de poivre noir sur la synthèse des aflatoxines</u>	67
1. Introduction	68
2. Matériel et méthodes	69
2.1. Solvants et réactifs	69
2.2. Extrait aqueux de poivre noir	69

2.3. Solution de pipérine	69
2.4. Souches fongiques	69
2.5. Culture fongique	71
2.6. Préparation des broyats	71
2.7. Mesure de la croissance fongique	72
2.7.1. Croissance, morphologie et sporulation	72
2.7.2. Dosage de l'ergostérol	72
2.7.3. Dosage des protéines	73
2.8. Analyses physico-chimiques	73
2.8.1. Dosage des mycotoxines	73
2.8.2. Marqueurs de stress oxydatif	75
2.9. Fractionnement par chromatographie flash des extraits de poivre	76
2.10. Analyse statistique	77
3. Résultats	78
3.1. Effet d'extraits aqueux de poivre noir sur la production des aflatoxines	78
3.1.1. Impact des extraits sur la production d'AFB1	78
3.1.2. Impact des extraits sur la croissance fongique	79
3.1.3. Aspect morphologique	80
3.2. Effet sur d'autres souches d' <i>Aspergillus flavus</i>	81
3.3. Effet sur d'autres espèces de la section <i>Flavi</i>	82
3.4. Effet sur les autres aflatoxines	84
3.5. Etude du mécanisme d'action des extraits de poivre noir	85
3.5.1. Effet du poivre sur le stress oxydatif	85
3.5.2. Identification du niveau de blocage de la voie de synthèse	86
3.6. Caractérisation de la (les) molécule(s) responsable(s)	90
3.6.1. Effet de la pipérine sur la production d'aflatoxine B1	90
3.6.2. Fractionnement des extraits et effet des différentes fractions sur la synthèse d'aflatoxine B1	93
4. Discussion	95
5. Conclusion et perspectives	99
Références bibliographiques	100
Attestation de dépôt du brevet	122

Introduction Générale

Les mycotoxines sont des contaminants fréquents de nombreuses denrées alimentaires et matières premières destinées à l'alimentation humaine et animale. Cette famille de composés regroupe plusieurs centaines de molécules de structures différentes et donc d'effets très variables.

Parmi les mycotoxines les plus connues et les mieux étudiées, l'aflatoxine B1 est l'une des plus préoccupantes pour la santé humaine. En effet, cette molécule est le plus puissant cancérigène naturel connu à ce jour, classée dans le groupe I des molécules cancérigènes pour l'homme et l'animal par l'Agence Internationale de Recherche contre le Cancer (IARC). L'aflatoxine B1 est plus particulièrement présente dans les productions des zones à climat tropical et subtropical car les conditions hydrothermiques y sont favorables à sa synthèse. La densité de population de ces zones (Asie, Afrique tropicale, Amérique du Sud) fait que de très nombreuses personnes sont exposées régulièrement à des concentrations plus ou moins importantes de ce génotoxique pour lequel aucune « dose tolérable » ne peut être définie et dont il convient de limiter autant que possible l'ingestion.

Plusieurs stratégies peuvent être déployées pour limiter la contamination des aliments par l'aflatoxine B1. Cependant, à l'heure actuelle, aucune d'entre elles ne permet d'éviter totalement et systématiquement la contamination et/ou la toxicité de ce composé. Il semble donc nécessaire de développer de nouvelles voies de lutte, pouvant venir en appui des méthodes existantes.

Dans ce cadre, notre travail vise à développer une stratégie alternative de lutte contre la contamination des aliments par l'aflatoxine B1 en identifiant des composés d'origine naturelle, capables d'inhiber spécifiquement la synthèse de cette mycotoxine, sans moduler la croissance fongique.

Cette approche pourrait, en complément des bonnes pratiques agricoles, permettre :

- d'améliorer la qualité sanitaire des aliments en évitant l'accumulation des composés toxiques

- de préserver la biodiversité et d'éviter ainsi l'émergence de nouveaux agents pathogènes susceptibles de coloniser le substrat « débarrassé » de ces moisissures.

Notre attention s'est plus particulièrement portée sur des composés d'origine naturelle, plus facilement compatibles avec des pratiques agricoles durables.

Après un rappel des principales données bibliographiques relatives à l'aflatoxine B1 et aux moyens de lutte disponibles, nous présenterons les résultats de nos travaux en deux parties :

- La première partie concerne l'analyse de la qualité fongique et mycotoxique d'épices commercialisées au Maroc. Ce premier travail nous a permis d'identifier le poivre noir comme candidat potentiel à l'inhibition de la toxino-génèse. En effet, bien que fréquemment contaminée par des spores de souches fongiques toxino-gènes, cette épice n'est que rarement contaminée par l'aflatoxine B1. Ce premier travail a été publié dans le journal *Food Control*.
- La seconde partie concerne l'effet d'extraits aqueux de poivre sur la synthèse des aflatoxines. Ce travail a abouti au dépôt d'une demande de brevet en décembre 2012 (*dépôt n°1262377*, voir pages 122-123)

Première Partie

Données Bibliographiques

1. Les mycotoxines : données générales

1.1. Définition

Le mot mycotoxine vient des termes «mycos» (champignon) et « toxicum » (poison). Les mycotoxines sont des composés de faibles poids moléculaires, toxiques pour l'homme et l'animal. Elles sont produites par un grand nombre de moisissures se développant sur différents types d'aliments bruts (céréales, oléoprotéagineux, fruits...) ou transformés. Plusieurs milliers de molécules toxiques ont été identifiées à ce jour, mais seule une vingtaine de familles posent, de part leur fréquence et/ou leur toxicité, des problèmes réels en santé humaine ou animale (Cahagnier *et al.*, 1998).

L'origine chimique des mycotoxines est très diverse. Certaines dérivent des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, slaframine, gliotoxine, roquefortine, sporodesmine), des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone), des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, désoxynivalénol, roridines, toxine T-2, verrucarine) ou encore des dérivés d'acides gras (fumonisines, alternariol) (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Les mycotoxines peuvent être responsables d'intoxications, appelées mycotoxicoses, chez les hommes comme chez les animaux.

Les troubles liés à l'ingestion de ces toxiques sont très variables en fonction des composés (nature, dose et mode d'exposition) mais aussi des espèces animales concernées. A l'heure actuelle, les relations doses-effets observés ne sont pas connues avec précision pour toutes les mycotoxines importantes.

1.2. Contamination des denrées alimentaires

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par des moisissures lors de leur développement. La nature des mycotoxines produites peut varier selon l'espèce fongique mais aussi selon le substrat colonisé par la moisissure

(Duverger *et al.*, 2011). Il convient de souligner qu'une mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces fongiques et que inversement, une espèce fongique peut produire plusieurs mycotoxines, parfois simultanément (Tableau 1).

Compte tenu de la faculté des moisissures à coloniser de nombreux substrats, la contamination mycotoxique est fréquente et on estime que près de 25% des céréales produites dans le monde sont contaminées (Bryden, 2007). Ceci entraîne, outre les éventuels impacts en santé publique, des pertes économiques non négligeables pour les différents maillons de la chaîne alimentaire. En effet, le développement fongique peut entraîner une altération de la valeur nutritionnelle et des qualités organoleptiques des aliments. De plus, la toxicité propre des toxines peut générer une diminution des performances zootechniques des animaux et donc entraîner des pertes économiques directes et importantes.

Les céréales sont les principales sources d'exposition de l'homme et des animaux aux mycotoxines car elles représentent un substrat très favorable à la croissance et à la toxinogénèse fongique. Elles peuvent être contaminées au champ, avant la récolte ou bien après, pendant le stockage. Les insectes peuvent jouer un rôle important dans la contamination mycotoxique des céréales en véhiculant les spores fongiques et en fragilisant les grains, les rendant plus accessibles au mycélium. On estime que c'est environ 55 millions de tonnes de céréales qui sont perdues chaque année dans le monde à cause de ces contaminations fongiques et mycotoxiques (d'après l'enquête réalisée par Pittet à l'échelle mondiale en 1998).

En fonction de leurs particularités écologiques, les différentes espèces fongiques vont se développer et produire des mycotoxines préférentiellement dans certaines régions où le climat est favorable. Par exemple, *Aspergillus flavus* se retrouve surtout dans les pays aux conditions climatiques chaudes et humides (en particulier les pays d'Afrique, d'Asie, d'Amérique du Sud et l'Australie) où la croissance des champignons est la plus favorisée (Bhat *et al.*, 2010). Ainsi, le riz, le maïs et le millet, aliments de base des populations de ces pays, sont souvent contaminés par les aflatoxines (Bandyopadhyay *et al.*, 2007). En 2009 et 2010, 25 % des échantillons d'arachides analysés en Chine se sont révélés contaminés par l'aflatoxine B1 (AFB1) à des teneurs comprises entre 0,01 et 720 µg/kg (Ding *et al.*, 2012).

En Afrique, une enquête sur la contamination par l'aflatoxine B1 des grains de maïs commercialisés au Bénin, au Ghana et au Togo a montré des niveaux de contamination par cette toxine de 24 à 117,5 ng/g, 0,4 à 490,6 ng/g et de 0,7 à 108,8 ng/g, respectivement (James *et al.*, 2007).

Les pays de l'Europe sont également touchés mais essentiellement par les toxines produites par des espèces fongiques appartenant au genre *Fusarium* dont la croissance et la toxigénèse ne requièrent pas forcément des températures élevées (Miedaner *et al.*, 2008).

Tableau 1: Principales mycotoxines, moisissures toxigènes et principaux substrats concernés (AFSSA, 2009)

Principales mycotoxines	Espèces fongiques productrices	Principaux aliments contaminés
Aflatoxines B1, B2, G1, G2	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Céréales, arachides, épices, fruits secs, noix
Ochratoxine A	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>P. verrucosum</i>	Céréales, raisins secs, grains de café, vin, jus de raisin
Trichothécènes (groupes A et B)	<i>F. langsethiae</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. acuminatum</i>	Céréales (blé, avoine et maïs)
Zéaralénone	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i>	Céréales
Patuline	<i>A. clavatus</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>Byssosclamyces nivea</i>	Céréales, pommes, poires
Fumonisines B1, B2, B3	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Maïs
Stérigmatocystine	<i>A. flavus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. versicolor</i>	Céréales, arachides, épices, fruits secs, noix
Citrinine	<i>A. terreus</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. niveus</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i>	Céréales, arachides, fruits et produits secs, noix, jus de pommes

1.3. Toxicité

La toxicité des mycotoxines dépend de leur nature chimique mais aussi de la dose et de la durée d'exposition, du mode d'exposition et enfin de l'espèce animale. Cependant, pour chaque toxine, des organes cibles et des effets majeurs peuvent être

identifiés. Ils sont récapitulés dans le tableau 2 pour les principales toxines d'intérêt en Europe.

Tableau 2: Toxicités des principales mycotoxines et mécanismes d'action (d'après AFSSA, 2009)

Toxines	Toxicité – organes cibles	Mécanismes d'action cellulaires et moléculaires
Aflatoxines B1 + M1	Hépatotoxicité Génotoxicité Cancérogénicité Immunomodulation	Formation d'adduit à l'ADN Peroxydation lipidique Bioactivation par cytochromes P450 Conjugaison aux GS-transférases
Ochratoxine A	Néphrotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de l'activité de la phosphoénolpyruvate carboxykinase Impact sur la synthèse des protéines par compétition Inhibition de la production d'ATP
Patuline	Neurotoxicité, Mutagenèse <i>in vitro</i> Cytotoxicité	Inhibition tyrosine phosphatase (PTP) Perturbation la fonction de barrière intestinale
Trichothécènes (Toxine T-2, DON, ..)	Hématotoxicité Immunomodulation Toxicité cutanée	Induction de l'apoptose sur progéniteur hématopoïétique et cellules immunitaires Impact sur la synthèse des protéines (élongation de la chaîne protéique)
Zéaralénone	Troubles de la fertilité et de la reproduction	Liaison aux récepteurs oestrogéniques Bioactivation par des réductases Conjugaison aux glucuronyltransférases
Fumonisine B1	Lésion du système nerveux central Hépatotoxicité, Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de la synthèse de céramide Altération du rapport sphinguanine/sphingosine Altération du cycle cellulaire

1.4. Réglementation

Les études toxicologiques réalisées aux cours des dernières années ont permis d'aboutir à l'établissement de réglementations et de recommandations pour certaines mycotoxines. Ainsi, les aflatoxines font l'objet d'une réglementation plus ou moins

complète dans un peu plus de 100 pays (correspondant à environ 85% des habitants du monde) (FAO, 2004; Van Egmond *et al.*, 2007).

En Europe, la commission européenne a établi un certain nombre de normes concernant les teneurs maximales tolérables en mycotoxines dans les aliments destinés à l'homme. Des exemples de valeurs fixées par cette réglementation européenne sont reportés dans le tableau 3.

De toutes les mycotoxines, les aflatoxines sont certainement les plus étudiées car les plus dangereuses pour l'homme. En effet, des études épidémiologiques menées notamment en Chine, au Kenya, ou en Afrique du Sud ont permis de prouver que ces mycotoxines étaient cancérigènes chez l'homme. Ce sont les seules mycotoxines classées par le Centre International de Recherche contre le Cancer dans le groupe I des composés cancérigènes avérés chez l'homme et l'animal (IARC, 1993). De plus, ces contaminants sont très fréquents dans certaines régions où le climat est favorable à la croissance des espèces fongiques productrices de ces toxines et à leur toxino-génèse. Ainsi, certaines populations sont très fréquemment exposées à ces contaminants et plus de 90% des habitants de certaines régions d'Afrique présentent des résidus d'AFB1 dans le sang (Wild et Gong, 2010). C'est pourquoi de nombreux travaux visent à définir des stratégies de lutte susceptibles de réduire l'exposition humaine à ces contaminants. Les valeurs fixées dans les aliments destinés à l'homme par cette réglementation européenne pour ces toxines sont récapitulées dans le tableau 4.

Tableau 3 : Réglementation européenne en vigueur concernant les teneurs en mycotoxines dans les denrées alimentaires destinées à l'homme (règlements N° 1881/2006, N° 1126/2007 et N° 594/2012 de la commission européenne)

Mycotoxines	Denrées	Teneurs maximales admissibles (µg/kg)
DON	• Blé dur, avoine et maïs bruts	1750
	• Autre céréales brutes	1250
	• Céréales destinées à la consommation humaine directe et pâtes	750
	• Produits à base de céréales et aliments pour nourrissons et enfants en bas âge	200
Fumonisines (FB1+FB2)	• Maïs brut	4000
	• Maïs destiné à la consommation humaine directe	1000
	• Céréales pour petit-déjeuner et collations à base de maïs	800
	• Préparations à base de maïs et aliments pour bébé destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	200
Ochratoxine A	• Céréales (dont riz et sarrasin) et produits dérivés, grains bruts	5
	• Vin (rouge, blanc et rosé) et autres boissons à base de vin et/ou de moût de raisins	2
	• Raisins secs	10
	• Épices, y compris séchées	15
Patuline	• Jus de fruits (pomme) et nectar de fruits	50
	• Spiritueux, cidres et boissons fermentées	50
	• Produits à base de morceaux de pomme (compote et purée)	25
	• Jus de pomme et produits à base de morceaux de pomme (compote et purée) pour nourrissons et enfants en bas âge	10
Zéaralénone	• Céréales brutes autres que le maïs	100
	• Maïs brut à l'exception du maïs brut destiné à être transformé par mouture humide	350
	• Céréales, farine de céréales, son et germe en tant que produit fini commercialisé pour la consommation humaine directe	75
	• Huile de maïs raffinée	400

Tableau 4 : Réglementation européenne en vigueur concernant les teneurs en aflatoxines dans les denrées alimentaires destinées à l'homme (règlement N° 165/2010 de la commission européenne)

Denrées alimentaires	Aflatoxines (µg/kg)		
	AFB1	AFB1, B2, G1, G2	AFM1
Arachides et autres graines oléagineuses destinées à être soumises à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires à l'exception des arachides et autres graines oléagineuses destinées à être broyées pour la fabrication d'huile végétale raffinée	8	15	-
Amandes, pistaches et noyaux d'abricot destinés à être soumis à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	12	15	-
Noisettes et noix du Brésil destinées à être soumis à un traitement	8	15	-

de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires			
Fruits à coque, exception faite des fruits à coque énumérés aux points, destinés à être soumis à un traitement de tri, ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédient de denrées alimentaires	5	10	-
Arachides et autres graines oléagineuses et produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires à l'exception: des huiles végétales brutes destinées à être raffinées des huiles végétales raffinées	2	4	-
Amandes, pistaches et noyaux d'abricot destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	8	10	-
Noisettes et noix du Brésil destinées à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	5	10	-
Fruits à coque, exception faite des fruits à coque énumérés et produits dérivés de leur transformation destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation directe comme ingrédient de denrées alimentaires	2	4	-
Fruits séchés destinés à être soumis à un traitement de tri ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	5	10	-
Fruits séchés et produits dérivés de leur transformation, destinés à la consommation humaine directe ou à une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	2	4	-
Toutes les céréales et tous les produits dérivés de céréales, y compris les produits de céréales transformés	2	4	-
Maïs et riz destinés à être soumis à un traitement de triage ou à d'autres méthodes physiques avant consommation humaine ou utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	5	10	-
Les épices: <i>Capsicum</i> spp. (fruits séchés dérivés, entiers ou en poudre, y compris les piments, la poudre de piment, le poivre de Cayenne et le paprika) <i>Piper</i> spp. (fruits dérivés, y compris le poivre blanc et le poivre noir) <i>Myristica fragrans</i> (noix de muscade) <i>Zingiber officinale</i> (gingembre) <i>Curcuma longa</i> (safran des Indes) Mélanges d'épices contenant une ou plusieurs des épices susmentionnées	5	10	-
Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge	0,10	-	-
Aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales spécifiquement pour les nourrissons	0,10	-	0,025
Lait cru, lait traité thermiquement et lait destiné à la fabrication de produits à base de lait	-	-	0,05
Préparations pour nourrissons et préparations de suite, y compris le lait pour nourrissons et le lait de suite	-	-	0,025

2. Les aflatoxines

2.1. Historique

Les aflatoxines ont été découvertes au début des années 1960. Elles ont été identifiées comme les agents responsables de "la maladie X des dindons" ayant entraîné la mort de plus de 100000 dindonneaux, canetons et poussins nourris avec des aliments contaminés par ces mycotoxines (farine d'arachide originaire d'Amérique du Sud) (Blount, 1961). Le nom « aflatoxine » est un acronyme formé selon la combinaison suivante: la première lettre «A» pour désigner le genre *Aspergillus*, la série des trois lettres «FLA» pour l'espèce *flavus* identifiée comme productrice de ces toxines, et le mot «toxine» pour le poison (Ellis *et al.*, 1991).

L'historique des principales découvertes concernant les aflatoxines et leur toxicité est schématisé sur la figure 1

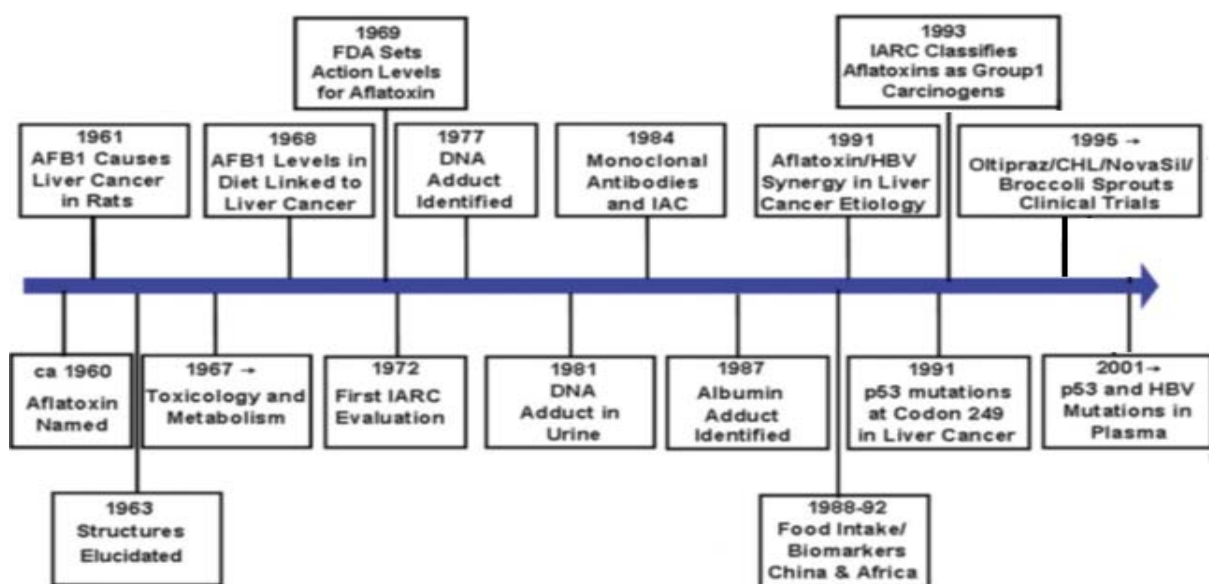


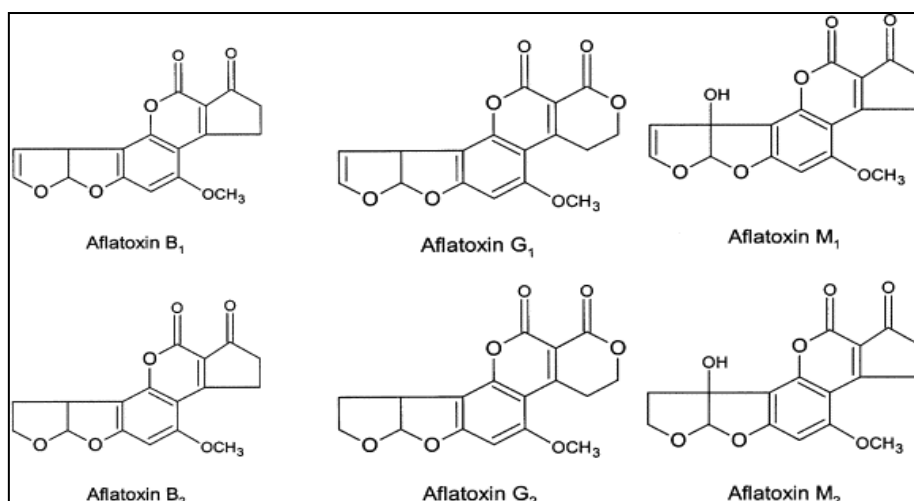
Figure 1: Ligne du temps des événements clés concernant la découverte des aflatoxines et leur mécanisme d'action (Kensler *et al.*, 2010)

2.2. Structure chimique et caractéristiques biochimiques

Les aflatoxines sont des composés organiques de nature non protéique. Ce sont des coumarines substituées contenant un fragment condensé dihydrofurofurane, dont les poids moléculaires sont compris entre 312 et 350 g/mol. Dix-huit différents types d'aflatoxines ont été identifiés (Mishra et Das, 2003), dont six sont plus connues (figure 2). Certaines sont produites directement par le champignon, ce sont les aflatoxines B1, B2, G1 et G2. Les autres apparaissent suite au métabolisme animal au niveau hépatique. Certains des métabolites produits correspondent à des dérivés 4-hydroxy, qui peuvent être excrétés dans le lait. Elles sont ainsi nommées aflatoxines M1 et M2 pour "Milk Aflatoxin". Les aflatoxines émettent une fluorescence bleue (AFB1 et AFB2) ou verte (AFG1 et AFG2). L'AFM1 émet, elle, une fluorescence bleue violette (Bennett et Klich, 2003). La structure des aflatoxines a été confirmée par leur synthèse totale en 1963 (Asao *et al.*, 1963).

Ces molécules sont peu solubles dans l'eau ; Elles sont solubles dans des solvants modérément polaires comme le chloroforme ou le méthanol. Elles sont stables dans une gamme de pH comprise entre 3 et 10. Les aflatoxines purifiées sous forme cristalline sont résistantes à la chaleur et leurs points de fusion sont situés aux alentours de 250 ° C.

L'aflatoxine B1 est le membre de la famille qui a fait l'objet du plus d'attention. En effet, c'est la toxine la plus communément produite. C'est aussi la plus toxique puisqu'elle a été identifiée comme étant cancérigène chez l'homme et l'animal (voir paragraphe 2.4.3).



Aflatoxines	Formule brute	Masse moléculaire g /mol
AFB1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312
AFB2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314
AFG1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328
AFG2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330
AFM1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328
AFM2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330

Figure 2: Structures chimiques et formules brutes des principales aflatoxines (Wogan, 1966 ; Zain, 2011)

2.3. Biosynthèse des aflatoxines

2.3.1. Principales espèces productrices d'aflatoxines

Les aflatoxines sont produites par des espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus*. C'est en 1729 que Micheli fut le premier à mettre en place une taxonomie du genre *Aspergillus*. En 1926, Thom et Church établirent la première classification complète du genre *Aspergillus*. Elle fut ensuite publiée en 1965 par Raper et Fennell.

Les *Aspergillus* appartiennent au groupe des Deutéromycètes (ou *Fungi imperfecti*). Les formes parfaites (téléomorphes) de quelques espèces sont connues et appartiennent à la division des Ascomycètes. Pour plusieurs espèces, le stade parfait demeure inconnu. Le genre *Aspergillus* comprend 8 sous genres eux mêmes divisés en 18 sections. Au total, le genre *Aspergillus* regroupe 180 espèces (Samson *et al.*, 2010).

Ils possèdent un mycélium cloisonné, portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés par une vésicule (figure 3).

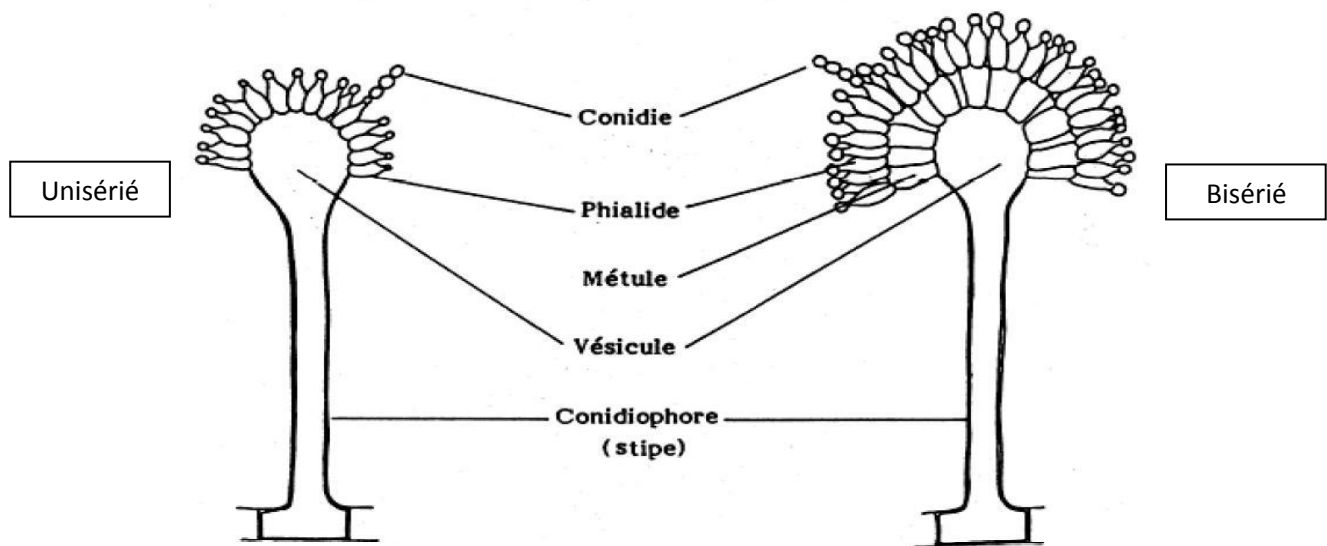


Figure 3: Structure morphologique du genre *Aspergillus* (Botton *et al.*, 1990)

Les aflatoxines sont produites par certains *Aspergillus* de la section *Flavi*, principalement par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Ces espèces sont en général caractérisées par les paramètres suivants :

- Les colonies développent généralement une teinte verte sur MEA, teinte plus ou moins prononcée en fonction de la présence de mycélium aérien stérile et de l'abondance de la sporulation.
- Au niveau microscopique, les conidiophores sont relativement longs, incolores, plus ou moins rugueux et portent, la plupart du temps, de belles têtes radiées au trois-quart. De petites têtes en colonnes sont possibles, notamment dans le mycélium aérien. Les vésicules sont généralement globuleuses, les phialides sont uni ou bi-sériées, les conidies globuleuses, plus ou moins ornementées. Les sclérotés sont possibles. Ils sont brun-rouge foncé à violet brun ou noir à maturité et globuleux, subglobuleux ou allongés verticalement (Raper et Fennell, 1965; Varga *et al.*, 2011).

2.3.1.a. *Aspergillus flavus*

Les colonies d'*Aspergillus flavus* sont vert-jaunâtre à vert olive (figure 4), relativement planes et peuvent avoir des sclérotés bruns ou noirs de forme et de taille variables. Les conidiophores sont longs mais généralement inférieurs à 1 mm. Leur paroi est épaisse et très rugueuse. La vésicule est subglobuleuse ou globuleuse (10 à 65 µm de diamètre) et les phialides sont majoritairement bisériées. Les conidies sont lisses ou légèrement rugueuses (3,5 à 4,5 µm). Cette espèce produit l'aflatoxine B1 et B2, de l'acide aspergillique, de l'acide kojique et souvent de l'acide cyclopiazonique (Hedayati *et al.*, 2007 ; Samson *et al.*, 2010).

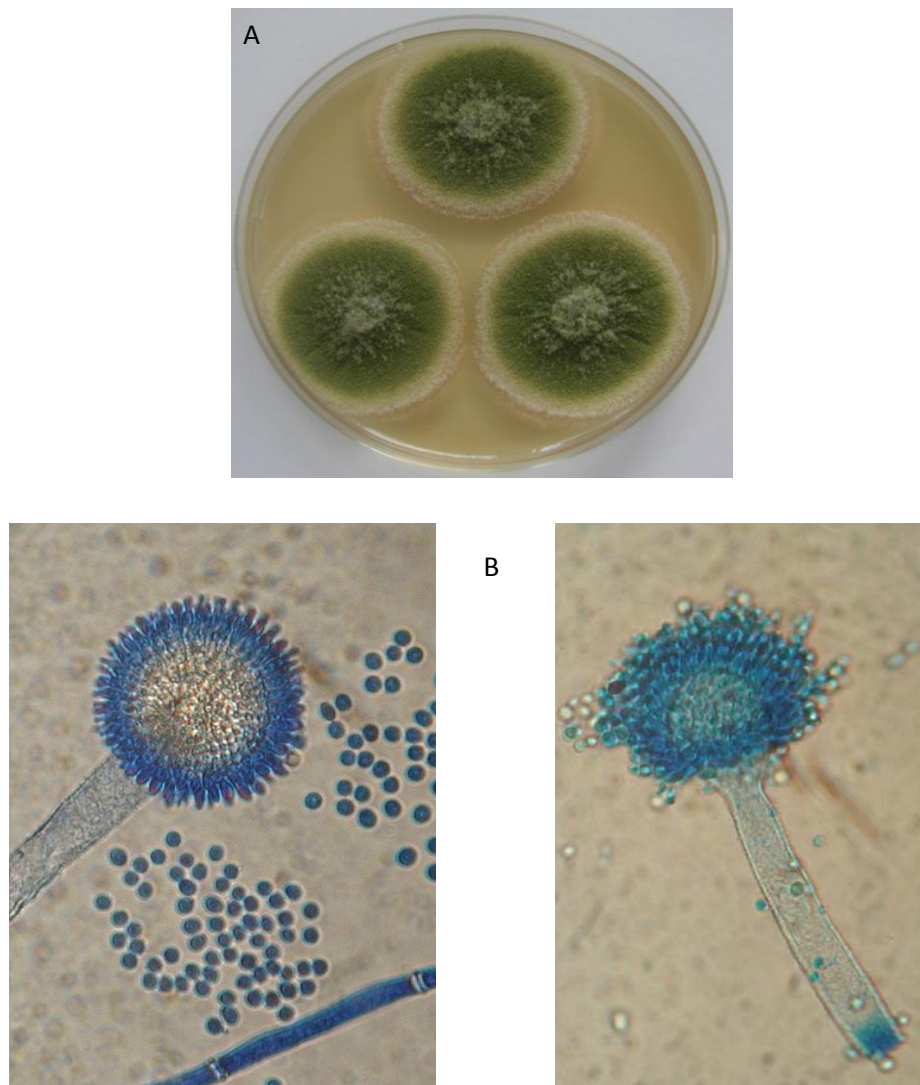


Figure 4 : *Aspergillus flavus*

A : colonie après 5 jours de culture sur MEA à 27°C

B : tête bisériée (gauche) et unisériée (droite) (x 400)

2.3.1.b. *Aspergillus parasiticus*

Les colonies d'*Aspergillus parasiticus*, sont vert foncé, couleur lierre, plus floconneuses que celle d'*A. flavus* sur MEA (figure 5). Les conidiophores sont incolores, de taille variable (300-700 μm). Leur paroi est lisse ou rugueuse dans la partie distale. Les vésicules sont globuleuses (20-35 μm), les phialides sont pour la plupart unisériées (>90%). Les conidies sont globuleuses, très échinulées voir épineuses (3,5 à 5,5 μm) (Hedayati *et al.*, 2007 ; Samson *et al.*, 2010). Cette espèce produit les aflatoxines B1, B2, G1 et G2, l'acide aspergillique, l'acide kojique mais pas l'acide cyclopiazonique.

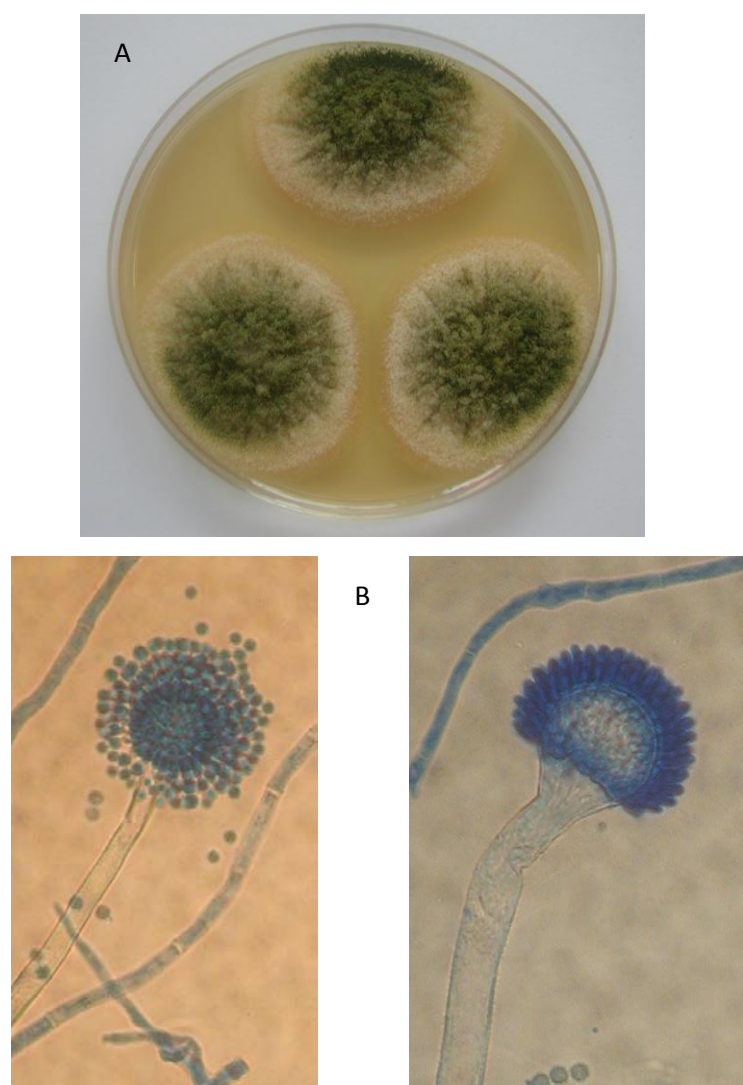


Figure 5 : *Aspergillus parasiticus*
A : colonie après 5 jours de culture sur MEA à 27°C
B : têtes unisériées, conidiophores et conidies

2.3.1.c. *Aspergillus nomius*

Les colonies d'*Aspergillus nomius*, sont très claires, floconneuses (figure 6). La sporulation est faible sur MEA et se limite souvent à la périphérie. Elles peuvent former des petits sclérotés bruns foncés à noirs allongés. Les conidiophores sont incolores (300-1100 μm). Leur paroi est échinulée. Les vésicules sont globuleuses à subglobuleuses (25-65 μm). Les phialides sont bi ou unisériées. Les conidies sont globuleuses à subglobuleuses, échinulées (Kurtzman *et al.*, 1987). Cette espèce produit les aflatoxines B1, B2, G1 et G2, l'acide aspergillique, l'acide kojique mais pas l'acide cyclopiazonique.

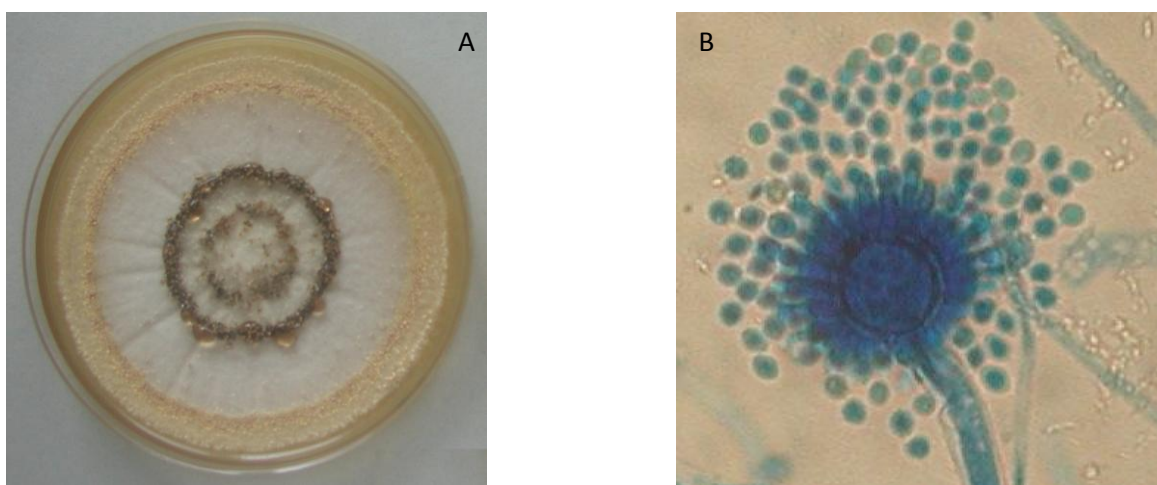


Figure 6 : *Aspergillus nomius*

A : colonie après 8 jours de culture sur MEA à 27°C (couronne de sclérotés)

B : vésicule, phialide et conidies (x 400)

Récemment de nouvelles espèces capables de produire des aflatoxines ont été identifiées. Leurs principales caractéristiques morphologiques et leur capacité à produire les différentes aflatoxines sont récapitulées dans le tableau 5. La plupart de ces espèces ont pu être distinguées d'*Aspergillus flavus* et/ou *parasiticus* grâce au développement des outils de biologie moléculaire et au séquençage de certains gènes d'intérêt (bêta-tubuline, calmoduline, ITS et mating type factor) (Ramirez-Prado *et al.*, 2008 ; Varga *et al.*, 2011).

Tableau 5 : Principales espèces d'*Aspergillus* de la section *Flavi* productrices d'aflatoxines

Souches	Caractéristiques morphologiques sur MEA		Distribution géographique (substrat)	Toxine		Référence
<i>Aspergillus arachidicola</i>	C	Vert olive à brun olive	Argentine (arachides)	AFB1	(+)	(Pildain <i>et al.</i> , 2008)
	P-S	(-)		AFB2	(+)	
	Co-ph	(r)		AFG1	(+)	
	vés	globose à subglobose		AFG2	(+)	
	Phi	UNI (BI)		ACP	(-)	
	Co	globose à subglobose, échinulée		AAG	(+/-)	
<i>Aspergillus bombycis</i>	C	jaune-vert	Japon (insectes)	AFB1	(+)	(Peterson <i>et al.</i> , 2001)
	P-S	(-)		AFB2	(+)	
	Co-ph	paroi lisse		AFG1	(+)	
	vés	globose		AFG2	(+)	
	Phi	BI		ACP	(-)	
	Co	globose à subglobose, (R)		AAG	(+/-)	
<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	C	Vert gris, moins sporulé	Argentine, (Arachides) Portugal (Amandes) Maroc (Epices)	AFB1	(+)	(Pildain <i>et al.</i> , 2008) (Elmahgubi <i>et al.</i> , 2013)
	P-S	(+) petites sclérotés		AFB2	(+)	
	Co-ph	(R)		AFG1	(+)	
	vés	globose à subglobose		AFG2	(+)	
	Phi	BI rarement UNI		ACP	(+)	
	Co	subglobose, échinulée ou lisse		AAG	(+)	
<i>Aspergillus mottae</i>	C	Peu sporulée et plate	Portugal (maïs)	AFB1	(+)	(Soares <i>et al.</i> , 2011)
	P-S	(+) brun foncé, petites sclérotés		AFB2	(+)	
	Co-ph	lisse		AFG1	(+)	
	vés	globose à subglobose		AFG2	(+)	
	Phi	BI (UNI)		ACP	(+/-)	
	Co	globose à subglobose, lisse ou (r)		AAG	(+)	
<i>Aspergillus novoparasiticus</i>	C	Jaune vert à olive	Brésil (expectoration, patient leucémique) Colombie (sol)	AFB1	(+)	(Gonçalves <i>et al.</i> , 2012)
	P-S	(-)		AFB2	(+)	
	Co-ph	Mutiseptés, verruqueux		AFG1	(+)	
	vés	Spatule à piriforme		AFG2	(+)	
	Phi	UNI rarement BI		ACP	(NP)	
	Co	globose à subglobose, (R)		AAG	(-)	

<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	C	jaune-vert	Nigeria (arachides)	AFB1	(+)	(Frisvad <i>et al.</i> , 2005)
	P-S	(+) petites sclérotés		AFB2	(+)	
	Co-ph	(r)		AFG1	(+)	
	vés	NP		AFG2	(+)	
	phi	NP		ACP	(+)	
	Co	NP		AAG	(+)	
<i>Aspergillus pseudocaelatus</i>	C	Olive à brun-olive	Argentine (arachides)	AFB1	(+)	(Varga <i>et al.</i> , 2011)
	P-S	(-)		AFB2	(+)	
	Co-ph	lisse		AFG1	(+)	
	vés	globose à subglobose		AFG2	(+)	
	Phi	UNI ou BI		ACP	(+)	
	Co	globose à subglobose, échinulée		AAG	(-)	
<i>Aspergillus pseudonomius</i>	C	floconneux, peu sporulé	Etats-Unis (insectes et sol)	AFB1	(+)	(Varga <i>et al.</i> , 2011)
	P-S	(-)		AFB2	(-)	
	Co-ph	lisse		AFG1	(-)	
	vés	globose à subglobose		AFG2	(-)	
	Phi	UNI		ACP	(-)	
	Co	globose à subglobose, échinulée		AAG	(-)	
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	C	Vert-olive, floconneux	Japon (champ de thé)	AFB1	(+)	(Ito <i>et al.</i> , 2001)
	P-S	(+) brun foncé à noir		AFB2	(+)	
	Co-ph	(r)		AFG1	(-)	
	vés	globose à subglobose		AFG2	(-)	
	phi	BI		ACP	(+)	
	Co	globose à subglobose, échinulée		AAG	(-)	
<i>Aspergillus sergii</i>	C	Vert	Portugal (amandes)	AFB1	(+)	(Soares <i>et al.</i> , 2011)
	P-S	(+) brun, grosses sclérotés		AFB2	(+)	
	Co-ph	lisse		AFG1	(+)	
	vés	globose		AFG2	(+)	
	Phi	UNI		ACP	(+)	
	Co	globose à subglobose, (R)		AAG	(+)	
<i>Aspergillus transmontanensis</i>	C	Vert foncé	Portugal (amande)	AFB1	(+)	(Soares <i>et al.</i> , 2011)
	P-S	(+) Marron grosses 458–609 µm		AFB2	(+)	
	Co-ph	lisse		AFG1	(+)	
	vés	globose à subglobose		AFG2	(+)	
	Phi	BI rarement UNI		ACP	(-)	
	Co	globose à subglobose, (R)		AAG	(+/-)	

C = colonie ; P-S = Production de sclérotés ; Production de sclérotés (-) négatif
Co-ph = conidiophore ; vés = vésicule ; Phi = phialides ; Co = Conidies
(R) = Très rugueux ; (r) = Finement rugueux ; (UNI) = Unisériées ; (BI) = bisériées
ACP= Acide Cyclopiazonique; AAG = Acide Aspergillique
Mycotoxines : (-) Non détectable ; (+) détectable
NP : non précisé dans la publication

2.3.2. Conditions de développement et de toxinogénèse

De manière générale, les moisissures sont des microorganismes aérobies qui se développent si le milieu leur apporte les éléments nutritifs nécessaires. Ne possédant pas de pigments assimilateurs, elles sont notamment hétérotrophes pour le carbone.

La paroi rigide de la cellule fongique l'empêche de phagocyter les substances nutritives complexes du milieu. La moisissure est obligée de les transformer préalablement en molécules simples facilement absorbables (monosaccharides, acides gras, acides aminés). Comme pour tous les microorganismes, la croissance fongique est aussi dépendante d'un certain nombre de paramètres environnementaux tels que la présence d'oxygène, l'activité hydrique et la température (Cahagnier *et al.*, 1998 ; Meyer *et al.*, 2004).

2.3.2.1. O₂ et CO₂

Les moisissures sont des microorganismes aérobies stricts : elles ont besoin d'oxygène pour pouvoir se développer. Cependant, *Aspergillus flavus* peut se développer sur les denrées alimentaires conservées dans une atmosphère pauvre en oxygène (Pfohl-Leszczowicz, 2001). Cette espèce peut aussi tolérer des concentrations assez importantes de CO₂ (20% CO₂, 0,5% O₂). Cependant, dans ces conditions, la moisissure ne peut produire d'AFB1. En présence de 40 et 60% CO₂ et 0,5% O₂, la croissance est aussi inhibée (Taniwaki *et al.*, 2009).

2.3.2.2. Température

Aspergillus flavus est classé parmi les moisissures mésophiles. Il se développe à une température allant de 10°C à 43°C (Mousa *et al.*, 2011). Cependant la température optimale de production des aflatoxines est voisine de la température optimale de croissance comprise entre 25 et 30°C (Mousa *et al.*, 2011) et la température optimale d'expression des gènes de régulation *aflR* et *aflS* est de 30°C (Yu *et al.*, 2011). La production des aflatoxines est quasiment inhibée quand la température est inférieure à 16°C et supérieure à 35°C (Tableau 6) (Bokhari et Aly, 2009).

Les spores de cette espèce ne peuvent pas germer à une température inférieure à 5°C, mais elles peuvent résister longtemps aux basses températures allant jusqu'à moins 20°C (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Tableau 6 : Influence de la température sur la croissance d'*A.flavus* et la production d'aflatoxine G1 après 10j de culture sur milieu au malt liquide (Bokhari et Aly, 2009).

Température	Croissance mg/ml	Quantité d'AG1 ng/g
10°C	6,8±2,4	ND
16°C	8,2±1,0	11,5
22°C	11,4±0,6	12
25°C	12,0±1,3	13
28°C	13,3±1,3	16
30°C	8,0±2,4	12
35°C	7,0±1,0	4,8
38°C	5,4±0,6	ND

ND non détectable

2.3.2.3. Le pH

Le pH influe directement sur la croissance d'*Aspergillus flavus* et sur la synthèse des aflatoxines. Le pH optimal pour la croissance est de 5 (Holmquist *et al.*, 1983), celui pour la synthèse des aflatoxines est compris entre 5 et 6 (Molina et Giannuzzi, 2002). Des études montrent que le pH joue un rôle important sur la production des aflatoxines et la formation des sclérotés. La production de sclérotés d'*Aspergillus flavus* est quasiment inhibée quand le pH est inférieur ou égal à 3 ; à pH 4 la production de sclérotés est réduite de 50% (Cotty, 1988).

2.3.2.4. Disponibilité de l'eau

L'activité hydrique est un paramètre qui caractérise la disponibilité d'eau libre dans une substance solide ou liquide. Elle est définie par l' a_w dont la valeur s'établit entre 0 (sécheresse absolue) et 1 (100% humidité relative).

La majorité des espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont des espèces xérophiles (*Eurotium*) ou modérément xérophiles (*Aspergillus flavus*). Pour la croissance, l' a_w minimale requise varie selon les espèces d'*Aspergillus* de la section *Flavi* entre 0,810

et 0,995 (Gibson *et al.*, 1994). *Aspergillus flavus* peut donc se développer dans les aliments relativement pauvres en eau comme les céréales en cours de stockage, les fruits secs et les produits dont l'activité hydrique a été réduite.

En ce qui concerne la toxinogénèse, la synthèse des aflatoxines par *Aspergillus flavus* nécessite une a_w supérieure à 0,85, l' a_w optimale étant comprise entre 0,95 et 0,99 (Tableau 7). Dans ces conditions, l'expression des gènes régulateurs (*aflR* et *aflS*) est elle aussi optimale (Schmidt-Heydt *et al.*, 2009).

Tableau 7 : Influence du couple hydro-thermique sur la production d'aflatoxine B1 sur milieu Yes agar (Schmidt-Heydt *et al.*, 2009)

a_w / T	Production d'AFB1 (ng/g)
0,90/25°C	3,66
0,95/25°C	830,24
0,99/25°C	1957,25
0,95/30°C	3016,94
0,99/30°C	2758,74

2.3.2.5. Substrat

Aspergillus flavus est une moisissure ubiquiste capable de coloniser de nombreux substrats. Son développement est favorisé par la présence, par ordre d'importance décroissante, de glucides, de lipides et enfin de protéines. Les céréales représentent donc un substrat dont la composition est optimale pour le développement d'*Aspergillus flavus* et sa toxinogénèse.

In vitro, le niveau de production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* diminue après 14 jours d'incubation en milieu liquide (Gqaleni *et al.*, 1997). Sur maïs, la cinétique est plus progressive et le niveau de production d'aflatoxine B1 est maximal à 14 jours alors que celui de l'aflatoxine G1 continue à augmenter jusqu'à 21 jours. Ainsi la synthèse d'aflatoxines (niveau de production et cinétique) dépend du type de substrat et de sa valeur nutritive.

Les conditions permettant la toxinogénèse des espèces productrices d'aflatoxines sont retrouvées dans de nombreuses zones géographiques dans le monde. La figure 7 illustre la répartition mondiale de ces toxines. Les conditions hydro-thermiques les

plus favorables à la toxinogénèse expliquent qu'on les retrouve plus spécifiquement des zones tropicales et sub-tropicales (Williams *et al.*, 2004).

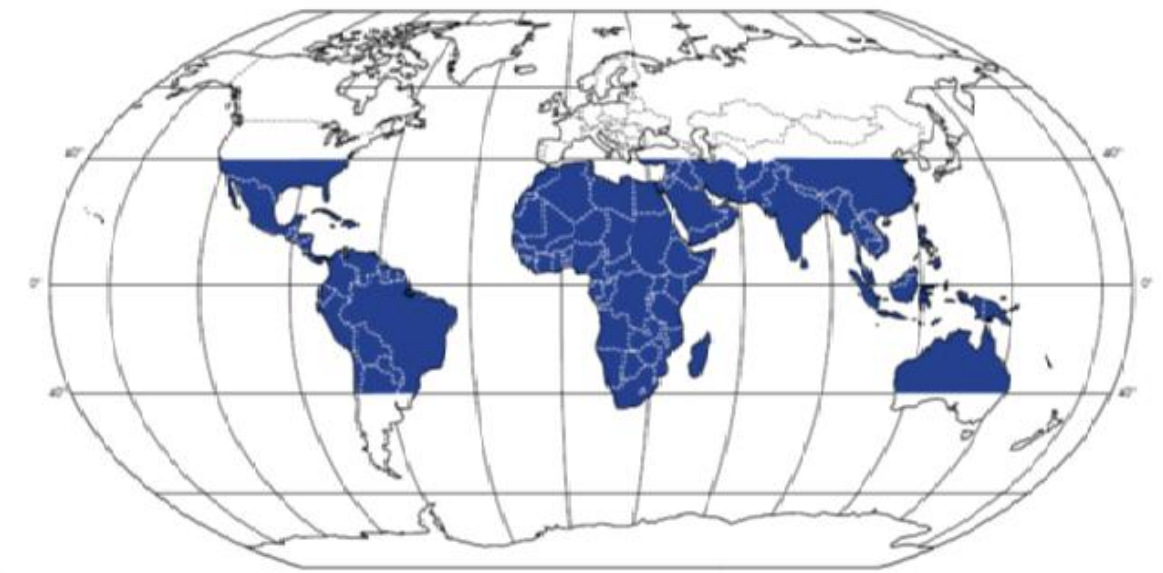


Figure 7: Prévalence des aflatoxines en fonction des régions (Williams *et al.*, 2004)

2.3.3. Voie de biosynthèse et régulation

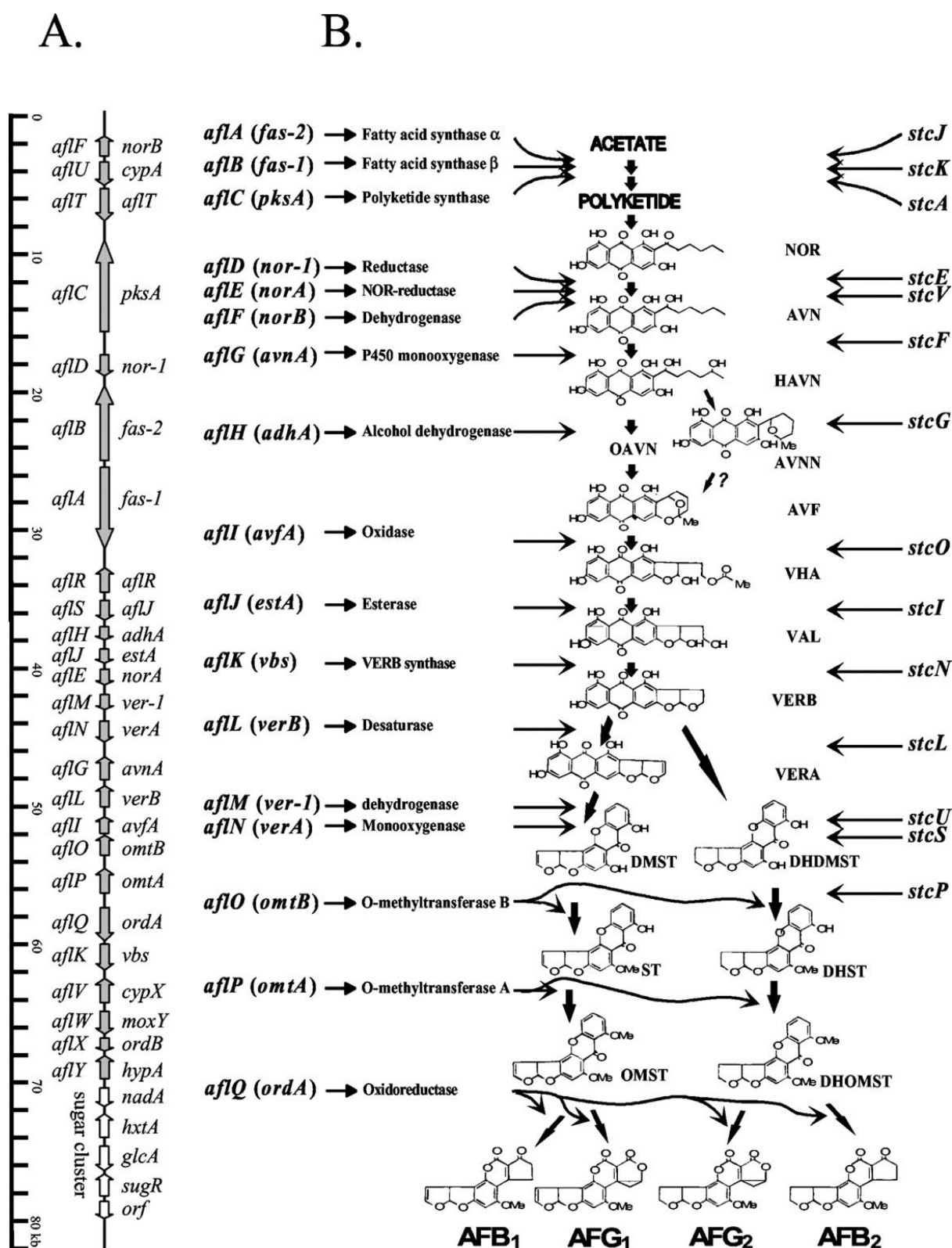
Les aflatoxines, comme toutes les mycotoxines, sont des métabolites secondaires. Il ne s'agit donc pas de protéines et les voies de biosynthèse permettant la production de ces composés sont généralement complexes. Ainsi, la synthèse des aflatoxines repose sur la succession de 15 intermédiaires permettant de passer d'une molécule d'acétate aux différentes molécules d'aflatoxine (Yu *et al.*, 2004b).

2.3.3.1. Gènes impliqués

La synthèse des aflatoxines nécessite une série de réactions d'oxydoréduction hautement organisées. Cette synthèse implique 30 gènes (Yu *et al.*, 2004a) intervenant dans une cascade de réactions enzymatiques allant de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) aux produits finaux : les aflatoxines B et G (Ehrlich, 2009 ; Yabe et Nakajima, 2004). Ces différentes étapes sont schématisées sur la figure 8.

La biosynthèse des aflatoxines commence par la conversion du malonyl-CoA en un polykétide condensé : la noranthrone. Cette réaction se fait grâce à l'action de deux acide gras synthases produites par les gènes *fas-1* et *fas-2* et d'une polykétide synthase issue du gène *pksA*. La noranthrone est à son tour transformée en acide norsolorinique, premier intermédiaire stable de cette synthèse (Trail *et al.*, 1995 ; Bennett *et al.*, 1997). Après une quinzaine de réactions enzymatiques, l'acide norsolorinique est converti en stérigmatocystine par l'enzyme O-Méthyl transférase codée par le gène *omtB* (Yu *et al.*, 1995). Ce second intermédiaire stable et tardif de la voie de biosynthèse des aflatoxines est ensuite transformé sous l'action d'une O-Méthyl transférase qui le convertit en o-méthylstérigmatocystine. Ce dernier précurseur sera oxydé pour donner l'aflatoxine B1 grâce à l'enzyme codé par le gène *ordA*. En plus du gène *ordA*, d'autres gènes comme *cypA*, *norB* et *nadA* permettent la transformation de l'o-méthylstérigmatocystine en AFG1 (Cai *et al.*, 2008).

Aspergillus flavus et *Aspergillus parasiticus* présentent tous les gènes du cluster sur le chromosome 3, regroupés au sein d'une région d'ADN de 82 kb (Yu *et al.*, 2004a). De plus, *Aspergillus parasiticus* possède plusieurs copies de certains des gènes (Carbone *et al.*, 2007).



2.3.3.2. Contrôle de la voie de biosynthèse des aflatoxines

Les gènes de la voie de biosynthèse des aflatoxines chez *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* sont exprimés simultanément (Chang, 2003). Les gènes, *aflR* et *aflS* (anciennement appelé *aflJ*), sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes de biosynthèse (figure 9) (Price *et al.*, 2006 ; Chang, 2004). Adjacents, ils sont situés au milieu du cluster de la voie de biosynthèse des aflatoxines (Chang, 2004). La transcription d'*aflS* est dépendante de celle d'*aflR* (Du *et al.*, 2007).

2.3.3.2.1. Le gène de régulation *aflR*

Ce gène code pour un facteur de transcription nommé AflR. Il est requis pour l'activation de la transcription de la plupart des gènes de structure du cluster des aflatoxines (Chang *et al.*, 1995). La suppression d'*aflR* chez *Aspergillus parasiticus* empêche l'expression des autres gènes de la voie de biosynthèse (Cary *et al.*, 2000). Chez *Aspergillus flavus*, la surexpression d'*aflR* régule à la hausse la transcription des gènes de la voie de biosynthèse des aflatoxines (Flaherty et Payne, 1997).

2.3.3.2.2. Contrôle associé à *aflS* (*aflJ*)

L'*aflS* est un gène bidirectionnel transcrit à la suite d'*aflR*. Il partage 737pb de la région inter génique avec *aflR*. L'absence de transcription du gène *aflS* est associé à une réduction (5 à 20 fois moins) de l'expression de certains gènes de la voie de biosynthèse comme *aflC* (*pksA*), *aflD* (*nor-1*), *aflM* (*ver-1*), et *aflP* (*omtA*) et conduit à une perte de la capacité de synthétiser les aflatoxines (Meyers *et al.*, 1998). Cependant, la suppression de *aflS* n'a pas d'effet perceptible sur la transcription de *aflR*, et vice versa.

La surexpression de *aflS* chez *Aspergillus flavus* n'entraîne pas de transcription élevée de *aflM* (*ver-1*), *aflP* (*omtA*), mais, par contre, elle conduit à une augmentation de l'expression des premiers gènes de la voie de synthèse des aflatoxines *pksA*, *nor-1*, *fas-1* et *fas-2* (Du *et al.*, 2007).

ce métabolite peut altérer le transport des électrons et la respiration cellulaire (cytochromes b et c) (Mclean et Dutton, 1995).

Ces interactions entre le métabolite de l'AFB1 et les constituants cellulaires sont responsables de la toxicité de la molécule, notamment au niveau hépatique.

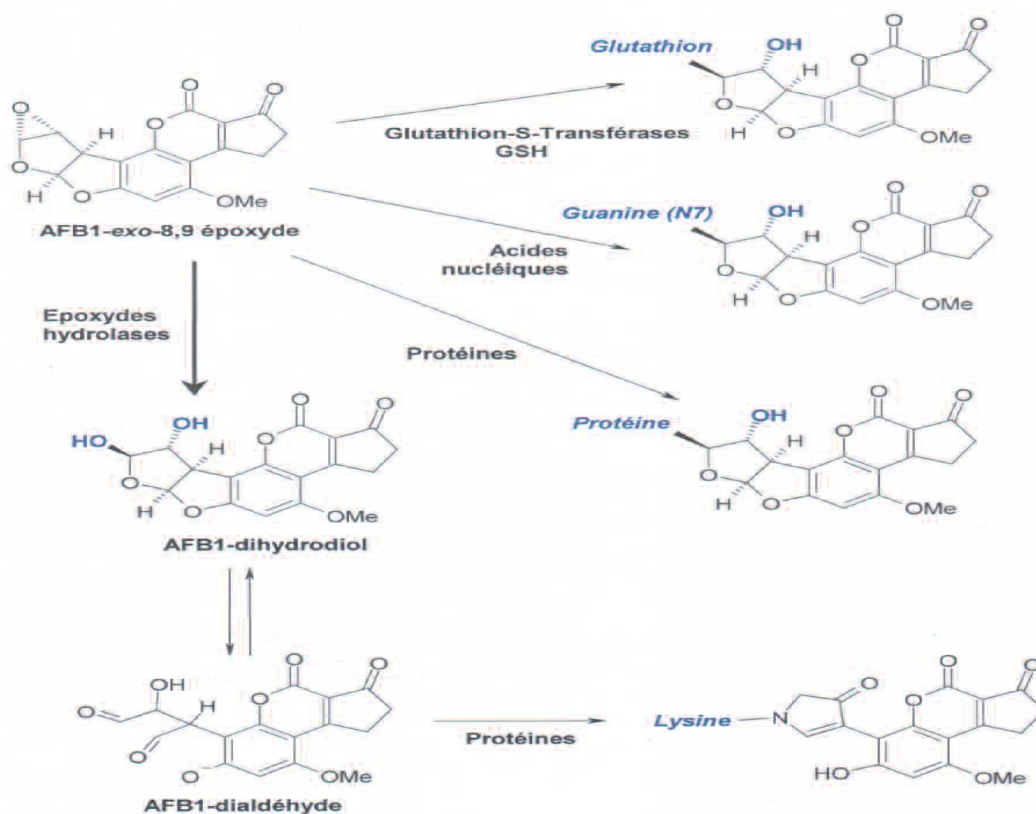


Figure 11: Interaction de l'AFB1-8,9 époxyde avec les constituants cellulaires (Galtier *et al.*, 2006)

2.4.3.Toxicité

La principale propriété toxique de l'AFB1 est son pouvoir cancérigène pour l'homme et l'animal (Do et Choi, 2007). Cependant, en fonction de la concentration en toxine, de la durée de l'exposition et de l'espèce animale, des troubles divers peuvent être rencontrés. L'aflatoxicose aiguë, faisant suite à l'ingestion de fortes doses de toxines, conduit généralement à la mort rapide des animaux alors que l'aflatoxicose

chronique peut aboutir au développement des cancers, à une immunodépression et à d'autres pathologies moins spécifiques (Hussein et Brasel, 2001). Dans tous les cas, le foie est l'organe cible de la toxine. Cependant, des différences substantielles de susceptibilité sont rapportées en fonction de l'espèce, du sexe, du poids, de l'alimentation, de l'exposition concomitante à des agents infectieux, et de la présence d'autres mycotoxines et substances actives (Do et Choi, 2007). Aussi, seules les principales caractéristiques de la toxicité de l'Aflatoxine B1 sont rapportées ici.

2.4.3.1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë peut être évaluée par la dose létale DL50 qui correspond à la concentration capable d'entraîner la mort de la moitié de la population testée, après une administration unique de toxique.

Chez l'animal :

Les études de la toxicité aiguë montrent une grande variabilité de sensibilité d'une espèce animale à l'autre (Hussein et Brasel, 2001) (tableau 8). Ainsi, les lapins et les canards sont très sensibles (DL50 par voie orale de 0,3 et 0,36 mg/kg poids corporel (p.c.), respectivement). Les chevaux, les veaux, les dindes et les moutons sont un peu moins sensibles (DL50 par voie orale de 1, 1,5, 1,36 et 2,0 mg/kg p.c., respectivement); Les poulets sont, quant à eux, relativement résistants aux aflatoxines (DL50 orale de 6,5 mg/kg p.c.) (Pier, 1992). L'intoxication aiguë par les aflatoxines se manifeste généralement par l'apparition d'une insuffisance hépatique aiguë dont les principaux signes cliniques sont : prostration, perte d'appétit, ictère et ascite. L'issue de l'intoxication est le plus souvent fatale. Sur le plan macroscopique, le foie apparaît décoloré et hypertrophié. On peut observer des hémorragies sur plusieurs organes (foie, poumons, reins et glandes surrénales) (AFSSA, 2009). Au plan microscopique, on note une prolifération des canaux biliaires, des lésions de nécrose et une infiltration graisseuse du foie (Do et Choi, 2007).

Tableau 8 : DL50 de l'AFB1 dans certaines espèces animales (Wild et Gong, 2010)

Espèce	DL 50 (mg/kg)
lapin	0.3
chat	0.6
porc	0.6
chien	0.5-1
rat mâle	5.50
souris	9.00
hamster	10.20
babouin	2,0
macaque	7,8

Chez l'Homme :

Dans la majorité des cas, les teneurs en mycotoxines observées dans les aliments destinés à l'homme ne sont pas suffisantes pour entraîner l'apparition d'une toxicité aiguë. Néanmoins, en ce qui concerne l'AFB1, la consommation de matières premières fortement contaminées a pu entraîner des signes cliniques importants chez les personnes exposées (Hall et Wild, 1994, Wild et *al.*, 1996). Comme chez les animaux, l'organe cible est le foie et les signes cliniques sont dominés par l'apparition d'une insuffisance hépatique : hépatite aiguë, ictère, accompagnés d'une dépression, d'anorexie et de diarrhée. Le premier cas d'aflatoxicose humaine aiguë a été décrit en 1981 au Kenya (Ngindu *et al.*, 1982) et le dernier épisode avéré s'est déroulé d'avril à septembre 2004 dans des provinces du centre et de l'est du Kenya (Probst *et al.*, 2007). Au cours de ce dernier épisode toxique, 317 cas ont été diagnostiqués conduisant à 125 décès. C'est l'ingestion de maïs hautement contaminé par l'aflatoxine B1 qui a été responsable de ces cas [Centre for disease control and prevention, 2004].

2.4.3.2. Toxicité chronique

La toxicité chronique des aflatoxines se manifestera après l'ingestion répétée de doses plus faibles que celles conduisant à l'intoxication aiguë. Ce type de toxicité peut être observé aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

Chez l'animal :

La toxicité chronique des aflatoxines est la forme d'expression toxique la plus fréquente dans les conditions de contamination naturelle des matières premières et des aliments pour animaux.

Dans la majorité des cas, les signes cliniques observés lors d'intoxication chronique sont beaucoup moins spécifiques et sont principalement caractérisés par une baisse des performances zootechniques (chute de ponte, diminution du gain de poids, réduction de la prise alimentaire) (AFSSA, 2009).

En parallèle, l'exposition prolongée aux aflatoxines entraîne l'apparition de lésions hépatiques dominées par une hyperplasie des canalicules biliaires et une fibrose. En cas d'exposition prolongée, l'apparition de tumeurs hépatiques a été décrite dans plusieurs espèces animales : les rongeurs, les primates et les poissons (Busby et Wogan, 1984; Eaton et Groopman, 1994). D'autres propriétés toxiques des aflatoxines ont aussi été rapportées. En effet, ces mycotoxines sont tératogènes (Arora *et al.*, 1981). Ainsi, elles entraînent chez les embryons de poulet un retard de développement, une microcéphalie, une anophtalmie, un palais fendu (bec de lièvre) et une déformation des maxillaires (Vesely *et al.*, 1983).

Les aflatoxines ont aussi un effet immunomodulateur et immunotoxique qui a été démontré essentiellement *in vitro*. L'AFB1 inhibe la phagocytose, la destruction intracellulaire des microorganismes et la production spontanée des radicaux libres oxygénés par les macrophages péritonéaux de rat (Theumer *et al.*, 2003) et, chez le bovin, l'AFB1 entraîne une réduction significative de l'activité phagocytaire des polynucléaires neutrophiles (Mehrzhad *et al.*, 2011). *In vivo*, les effets varient suivant l'espèce, l'âge, le sexe, l'état physiologique de l'animal, le mode d'administration, la composition des aliments (tableau 9). Par exemple, chez le lapin, l'AFB1 entraîne une réduction significative de la prolifération des lymphocytes (Ra et Ma, 1996).

Tableau 9: Toxicité chronique de l'AFB1. Tableau clinique chez quelques espèces animales.

Espèce	Dose	Temps	Observations	
Carpe indienne (Labeo rohita)	1,25-5,00 mg/kg pc administration unique par injection	60-90 jours	Réponse immunitaire : Diminution de la réponse non spécifique (concentrations sériques en protéines totales et en albumine réduites, augmentation du ratio A:G, activités bactéricides du sérum et des lysozymes et de phagocytose des neutrophiles réduites) et de la réponse spécifique (titre d'agglutination bactérien contre <i>Edwardsiella tarda</i> et nombre d'anticorps réduits) dès 1,25 mg d'AFB1/kg poids, augmentation de la mortalité après inoculation avec <i>Edwardsiella tarda</i> ou avec <i>Aeromonas hydrophila</i>	(Sahoo et Mukherjee, 2001) (Sahoo et Mukherjee, 2003)
Lapins mâles adultes	15 -30 mg/kg pc administration par voie orale	18 semaines	Diminution du gain de poids, réduction de la sécrétion de testostérone et la réduction du poids des testicules	(Salem <i>et al.</i> , 2001)
Porc	0,14 mg/kg pc	Période de croissance de 20 à 70 kg	Diminution du gain de poids Hépatocytes vacuolés et anisocaryose dans les zones périportales du foie Prolifération des canalicules biliaires	(Duthie <i>et al.</i> , 1966)
	0,28 mg/kg pc			
	0,41 mg/kg pc			
Truite arc-en-ciel (Oncorhynchus mykiss)	0,5 mg/L par balnéation (embryons lors de l'exposition)	30 minutes d'exposition	Fonction immunitaire affectée	(Ottinger et Kaattari, 2000)
	0,02 mg/kg aliment	4 semaines d'exposition et 1 an de suivi des animaux	Cancers du foie (62%)	(Bailey <i>et al.</i> , 1988)

Chez l'homme :

L'intoxication chronique sera liée à la consommation régulière d'aliments contaminés par de faibles niveaux d'aflatoxines, en particulier d'aflatoxine B1. Cette dernière peut entraîner le développement de carcinome hépatocellulaire, des troubles de la fonction immunitaire ainsi qu'un retard de croissance chez les enfants.

L'aflatoxine B1 est le plus puissant carcinogène hépatique connu. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le carcinome hépatocellulaire est la troisième cause de décès lié au cancer dans le monde. Cette propriété a justifié que

l'AFB1 soit classé par le CIRC dans le groupe I des molécules cancérogènes pour l'homme et l'animal (Vainio *et al.*, 1992 ; IARC, 2002).

La plupart des études épidémiologiques tendent à montrer l'existence d'une corrélation entre une exposition chronique à l'aflatoxine B1 via le régime alimentaire et la prévalence du cancer primitif du foie (hépatocarcinomes) (AFSSA, 2009). Il existe une synergie entre la mycotoxine et le virus de l'hépatite B (Omer *et al.*, 2004). C'est surtout dans les zones où le climat est très favorable à la production de la mycotoxine que ces corrélations ont pu être démontrées et que l'aflatoxine B1 représente un enjeu majeur de santé publique : Afrique sub-saharienne, Asie du Sud et Chine (Figure 12). Dans le monde, on estime que les aflatoxines pourraient être responsables de 4,6 à 28,2% des cancers hépatiques (Liu et Wu, 2010).

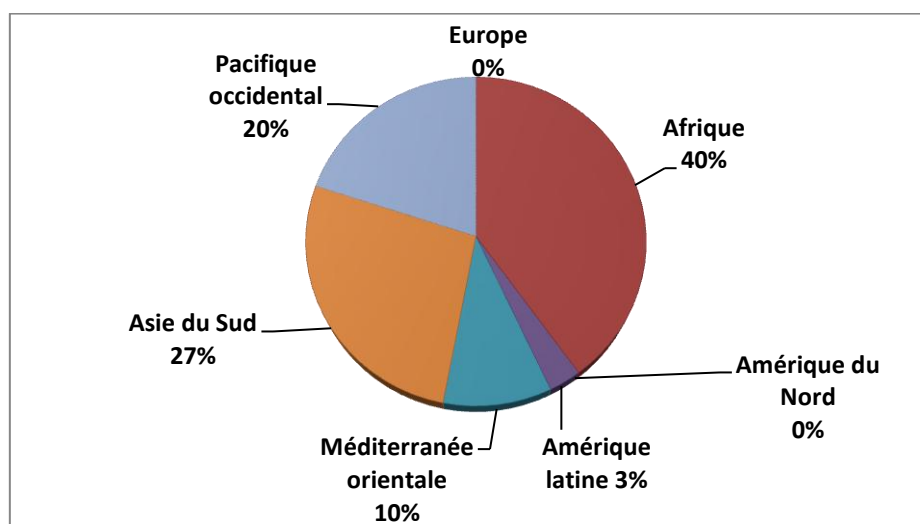


Figure 12 : Répartition géographique des carcinomes hépatocellulaires attribuables à l'aflatoxine B1 (d'après Liu et Wu, 2010).

Les aflatoxines ont aussi un effet immunomodulateur et immunotoxique. Cela a été démontré dans une étude qui a examiné le statut de l'immunité cellulaire de 64 Ghanéens en relation avec les niveaux d'adduits à l'aflatoxine B1 (AFB1)-albumine dans leur plasma. Leurs résultats montrent qu'un taux plasmatique d'AFB1 élevé est corrélé à des troubles de l'immunité cellulaire qui pourraient diminuer la résistance de l'hôte aux infections (Jiang *et al.*, 2005).

Chez les enfants, les aflatoxines ont un effet négatif sur la croissance (Tableau 10). Une étude réalisée au Bénin et au Togo a montré une corrélation entre la teneur en adduits d'AFB1 sur l'albumine sérique et un déficit de poids et de taille des enfants (Figure 13) (Gong *et al.*, 2002). Cette exposition est plus importante chez les enfants après le sevrage, à cause du niveau plus important de contamination des aliments ingérés à partir de cette période (Gong *et al.*, 2004).

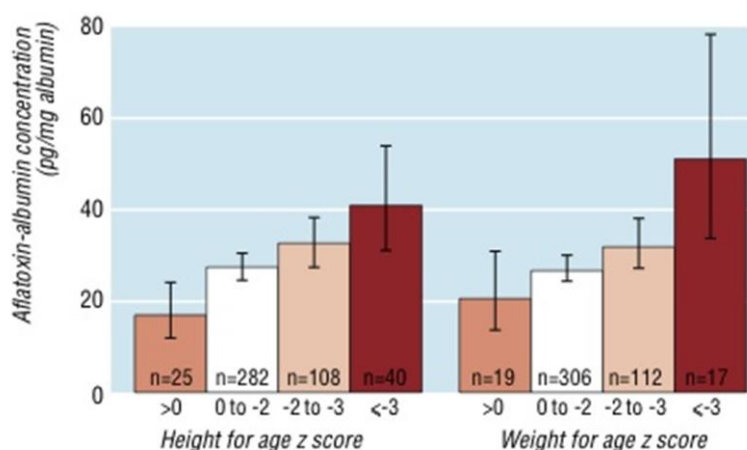


Figure 13 : Concentration des adduits sériques AFB1-Albumine en fonction des groupes d'enfants et de leur score Z (score attribué selon la classification de la malnutrition établie par l'Organisation Mondiale de la Santé) (Gong *et al.*, 2002).

Z < -2 : malnutrition ; Z < -3 : malnutrition sévère

Tableau 10 : Effet-dose de l'AFB1 sur la croissance des enfants (Khlangwiset *et al.*, 2011)

Pays	Quantité d'AFB1 ingérée (ng/kg.pc par jour)	% de retard de croissance des enfants
Argentine	0 -4	8
Chine	17 - 37	22
Espagne	0,3- 1,3	non déclarée
Etats-Unis	0,26	4
France	0,3- 1,3	non déclarée
Inde	4-100	48
Kenya	3,5-133	36
Gambie	4 - 115	28
Nigeria	139 - 227	43
Philippines	44 - 54	34
Tanzanie	0.02 - 50	44
Thaïlande	53 - 73	16

2.5. Contamination des aliments

Les aflatoxines sont capables de contaminer de très nombreux substrats. Cependant, ces contaminants sont plus fréquents dans les céréales (maïs, blé, orge, avoine, seigle, riz), dans les fruits secs (noix, pistaches, arachides) et leurs dérivés (beurre d'arachides), dans les légumineuses (lentilles), dans les épices, dans les fruits séchés (figues, raisins secs). Ces métabolites secondaires se retrouvent dans ces aliments, notamment lorsqu'ils sont produits dans des régions à climat chaud, et plus spécifiquement dans les zones tropicales et sub-tropicales.

2.5.1. Produits végétaux

2.5.1.1. Céréales

Les céréales sont les principales sources d'exposition de l'homme et des animaux aux aflatoxines car elles représentent un substrat très favorable à la croissance et à la toxino-génèse (Probst *et al.*, 2010). Elles peuvent être contaminées à plusieurs niveaux (en plein champ ou lors du stockage). En effet, de mauvaises procédures de stockage des produits agricoles peuvent entraîner une ré-humidification des grains et favoriser la toxino-génèse au cours du stockage (Cotty, 1997). Depuis la découverte de ces mycotoxines, de très nombreuses études ont visé à caractériser la contamination des céréales, notamment dans les zones géographiques sensibles où elles représentent une part importante de l'alimentation et donc une source majeure d'exposition humaine (Sangare-Tigori *et al.*, 2006; Ok *et al.*, 2007), mais aussi animale. Ainsi, la mise en évidence d'une contamination des céréales au Kenya précède souvent des flambées d'aflatoxicose (Probst *et al.*, 2010). Dans ce manuscrit ne seront présentées que les études les plus récentes. Ainsi, le tableau 11 récapitule les résultats des enquêtes publiées depuis 2005.

En Europe, il est classiquement considéré que les productions sont indemnes de ces toxines. Cependant, récemment, plusieurs alertes et études ont rapporté une contamination des céréales européennes par ces toxines (Riba *et al.*, 2010 ; Tabuc *et al.*, 2011 ; Villa et Markaki, 2009). Il est probable que les modifications climatiques globales puissent générer une émergence de ces contaminants dans les pays

européens (Giorni *et al.*, 2007). C'est pour cette raison que l'EFSA a lancé il y a quelques années un projet visant à modéliser l'impact des modifications climatiques sur l'émergence des aflatoxines en Europe.

Tableau 11 : Présence des aflatoxines dans les céréales et les produits à base de céréales

Origine géographique	Produit	Nombre d'échantillons	Toxine	Niveau de contamination (µg/ Kg)	% échantillons positifs	Références
Algérie	Blé	55	AFB1	0,13 – 37,42	54,5	(Riba <i>et al.</i> , 2010)
Argentine	Drêches de brasserie (J0)	26	AFB1	5.40–26.88	57	(Gerbaldo <i>et al.</i> , 2011)
	Drêches de brasserie (J7)	24	AFB1	4.32–446.40	50	
Corée	Riz	88	AFB1	1.8–7.3	5,7	(Park <i>et al.</i> , 2005)
Côte d'Ivoire	Maïs	10	AFB1	1,5 – 20	100	(Sangare-Tigori <i>et al.</i> , 2006)
	Riz	10	AFB1	1,5 – 10	100	
France	Maïs	NP	AFB1	4- 34	NP	(Garon <i>et al.</i> , 2006)
Grèce	Céréales de petit déjeuner mixtes	23	AFB1	0,05 - 4,3	47,8	(Villa et Markaki, 2009)
Nigéria	Maïs	23	AF totales	1,1 – 480	100	(Bandyopadhyay <i>et al.</i> , 2007)
	Sorgho	40	AF totales	1,6 – 90	100	
	Millet perlé	7	AF totales	2,6 – 8,1	100	
Roumanie	Maïs	54	AFB1	0 – 48,1	30	(Tabuc <i>et al.</i> , 2009)
Serbie	Céréales du petit déjeuner	11	AF totales	0,492 – 2,60	63,6	(Jaksic <i>et al.</i> , 2011)

NP : non précisé dans la publication

2.5.1.2. Fruits à coque, fruits secs, graines de cucurbitacées

Les fruits à coque font partie des aliments qui peuvent être contaminés par les aflatoxines.

Les arachides et les pistaches sont les plus étudiées car elles sont un substrat favorable pour la croissance et la toxinogénèse. La contamination par l'AFB1 est un problème important aux États-Unis, en Asie et en Afrique (Bhatnagar *et al.*, 2004 ; Bonjar, 2004 ; Chala *et al.*, 2013).

Une étude montre que la contamination des pistaches par les aflatoxines peut avoir lieu à toutes les étapes de la chaîne de production (récolte, entreposage et stockage) (Georgiadou *et al.*, 2012). De ce fait, le niveau d'aflatoxines est parfois très élevé, allant de 11 à 1361 µg/kg à la cueillette à 650 à 1100 µg/kg après stockage (Georgiadou *et al.*, 2012). Les données les plus récentes concernant la contamination de ces produits par les aflatoxines sont récapitulées dans le tableau 12.

Tableau 12 : Présence des aflatoxines dans les fruits à coque, fruits secs, graines de cucurbitacées

Origine géographique	Produit	Nombre d'échantillons	Toxine	Niveau de contamination (µg/Kg)	% échantillons positifs	Référence
Chine	Arachides	1040	AFB1	0,01-720	25	(Ding <i>et al.</i> , 2012)
Corée du Sud	Noix	1	AF totales	7,89	100	(Chun <i>et al.</i> , 2007)
Ethiopie	Arachides	120	AF totales	15-11900	77,5	(Chala <i>et al.</i> , 2013)
Grèce	Pistaches	80	AF totales	11- 1361	78	(Georgiadou <i>et al.</i> , 2012)
Maroc	Figes sèches	20	AF totales	0,28-32,9	30	(Juan <i>et al.</i> , 2008)
	Noix	20	AFB1	0,56 -2500	30	
			AF totales	1,24 -4320	30	
	raisins secs	20	AFB1	3,2 – 13,9	20	
Nigéria	Graines de melon	233	AF totales	2-15	25,8	(Bankole <i>et al.</i> , 2010)
Portugal	Amandes	21	AFB1	4,8	4,8	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2012)
			AFB2	0,17	4,8	
Qatar	Pistaches avec coque	47	AF totales	0,53-75	27,6	(Abdulkadar <i>et al.</i> , 2000)
	Pistaches sans coque	23	AF totales	8,3-289	52	
	Pistaches	6	AF totales	0,23-81,6	50	(Abdulkadar <i>et al.</i> , 2004)
	Arachides	4	AF totales	0,17-2,13	66,7	
	Figes sèches	6	AF totales	0,7-11,8	50	

2.5.1.3. Les épices

La présence d'aflatoxines dans les épices a fait l'objet de beaucoup d'études. Leur présence dans ce type d'aliment est possible pour plusieurs raisons :

- De nombreuses épices sont produites dans des pays ayant un climat tropical ou subtropical et dont les conditions climatiques (température, humidité et précipitations) sont favorables au développement fongique (Mandeel, 2005)
- *A.flavus* est un contaminant important dans certaines épices (poivre noir, poivre blanc, paprika et cumin) (Zinedine *et al.*, 2006).
- Certaines épices se sont révélées être des substrats favorables pour la synthèse des aflatoxines comme par exemple, le gingembre et le cumin (Shundo *et al.*, 2009a).

Les études réalisées sur la contamination des épices et publiées au cours des 7 dernières années sont récapitulées dans le tableau 13.

L'activité hydrique est un facteur clé de la contamination des épices. Ainsi, les procédures de séchage de ces aliments après récolte pourraient être un élément déterminant dans la qualité finale des produits.

Tableau 13 : Présence des aflatoxines dans les épices

Épices	Origine géographique	Nombre d'échantillons	Toxine	Niveau de contamination (µg/kg)	% échantillons positifs	Références
Cumin	Maroc	14	AFB1	0,03	57	(Zinedine et al 2006)
			AF totales	0,05	57	
Curry	Corée	20	AFB1	0.13-0.46	10	(Cho <i>et al.</i> , 2008)
Farine de piment rouge	Corée	41	AFB1	0.08-4.66	17,1	
Gingembre	Maroc	12	AFB1	0,63	86	Zinedine <i>et al.</i> , 2006)
			AF totales	1,47	86	
Gingembre	Corée	7	AFB1	0.18	14,3	(Cho <i>et al.</i> , 2008)
Paprika	Maroc	14	AFB1	2,88	100	(Zinedine <i>et al.</i> , 2006)
			AF totales	5,23	100	
	Brésil	70	AFB1	0,5-7,3	61,4	(Shundo <i>et al.</i> , 2009a)
Piment pili pili	Turquie	30	AFB1	1,9-35,5	43,3	(Colak <i>et al.</i> , 2006)
			AF totales	0,7-46,8	56,7	
Piment rouge	Turquie	100	AFB1	0,25-5	50	(Aydin <i>et al.</i> , 2007)
		30	AFB1	2,9-11,2	20	(Colak <i>et al.</i> , 2006)
			AF totales	0,8-15,4	36,7	
Poivre noir	Corée	2	AFB1	ND	0	(Cho <i>et al.</i> , 2008)
	Maroc	15	AFB1	0,09	47	(Zinedine <i>et al.</i> , 2006)
			AF totales	0,21	93	
	Turquie	24	AFB1	9,8-10,3	8,3	(Colak <i>et al.</i> , 2006)
			AF totales	0,3-16,7	33,3	
Pâte de piment rouge	Corée	15	AFB1	0.18-0.21	13,3	(Cho <i>et al.</i> , 2008)
			AF totales	0.21-0.55	13,3	

ND non détectable

2.5.2.Denrées animales et d'origines animales

2.5.2.1. Viandes et produits de la charcuterie

La contamination des viandes pourrait résulter de l'exposition des animaux et de l'accumulation des toxines dans certains tissus (Olufunmilayo et Oyefolu, 2010). Le métabolisme des aflatoxines au niveau hépatique est tel que leur accumulation en grande quantité sous forme native dans les viandes est peu probable. Néanmoins, des résidus de toxines peuvent parfois être détectés dans le foie et les reins des animaux exposés (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Une étude montre que le niveau d'aflatoxines dans les tissus est plus élevé en hiver qu'au printemps. Ceci s'explique par l'alimentation des animaux. En hiver, ils consomment des aliments stockés dans lesquels la production de toxine a pu avoir lieu alors qu'au printemps, le pâturage est la principale source d'alimentation (Herzallah, 2009).

Le séchage de la viande et des produits carnés entraîne une augmentation de la concentration en aflatoxines par élimination d'une partie de l'eau des tissus (Olufunmilayo et Oyefolu, 2010).

2.5.2.2. Lait et produits laitiers

L'aflatoxine B1 est transformée au niveau hépatique en aflatoxine M1 qui peut être excrétée dans le lait. Ainsi l'AFM1 retrouvée dans le lait chez la vache représente de 0,4 à 3 % de la quantité d'AFB1 ingérée par les animaux (Stoloff, 1980). Chez la chèvre, elle représente 0,17% de la totalité de l'AFB1 administrée (Battacone *et al.*, 2012). Il est démontré que le lait produit pendant les saisons chaudes est moins contaminé par l'AFM1 que le lait produit pendant les saisons froides, là encore en raison des modalités associées d'alimentation des animaux (Fallah *et al.*, 2011 ; Peng et Chen, 2009).

L'excrétion de cette mycotoxine dans le lait a fait l'objet de nombreuses études car ce métabolite conserve une partie du potentiel toxique de l'AFB1 (Van Eijkeren *et al.*, 2006). Ainsi, l'aflatoxine M1 est classée par le CIRC dans le groupe 2B des agents cancérogènes chez l'animal et probablement cancérogène chez l'homme (IARC, 1993 ; IARC, 2002).

Les produits laitiers et les fromages ont des niveaux de contamination qui varient d'une étude à l'autre (Fallah *et al.*, 2009). La teneur en AFM1 n'est que peu modifiée par les traitements technologiques du lait.

Quelques données récentes concernant la présence de l'aflatoxine M1 dans les produits laitiers sont présentées dans le tableau 14.

Tableau 14 : Présence de l'aflatoxine M1 dans le lait et les produits laitiers

Origine géographique	Lait et produits laitiers	Nombre d'échantillons	Niveau de contamination (ppb)	% échantillons positifs	Références
Brésil	Lait UHT	40	10-500	100	(Shundo <i>et al.</i> , 2009b)
	Lait pasteurisé	10	10-20	70	
	Lait en poudre	75	10-500	96	
Chine	Lait pasteurisé	26	23-154	96.2	(Zheng <i>et al.</i> , 2013)
	Lait UHT	153	6-160	54.9	(Zheng <i>et al.</i> , 2013)
Egypte	Lait cru	175	0-500	100	(Motawee <i>et al.</i> , 2009)
France	Lait cru	264	5-26	3,4	(Boudra <i>et al.</i> , 2007)
Iran	Lait UHT	109	5,6-515,9	62,3	(Fallah, 2010)
	Lait pasteurisé	116	5,8-528,5	71,5	(Heshmati et Milani, 2010)
	Lait UHT	210	8-249	55,2	
	Fromage blanc	50	40,9-374	60	(Tavakoli <i>et al.</i> , 2012)
	Fromage blanc	116	52.1-744.5	80,1	(Fallah <i>et al.</i> , 2009)
	Fromage à la crème	94	58.3-785.4	72,3	
Portugal	Lait UHT et pasteurisé	40	6,9-69,7	27,5	(Duarte <i>et al.</i> , 2013)
Thaïlande	Lait cru	240	14-197	35,4	(Ruangwises et Ruangwises, 2010)
Taiwan	Lait pasteurisé	144	1,17-54,7	100	(Peng et Chen, 2009)
Turquie	Lait UHT	129	0-543,64	58,1	(Unusan, 2006)

2.5.2.3. Les œufs

L'exposition des poules peut entraîner une contamination secondaire des oeufs. Une étude a montré que l'alimentation de poules avec des aliments contenant 3300mg/kg d'AFB1 pendant 28 jours entraînait une contamination des œufs à un

niveau de 0,5µg AFB1/kg. Une autre étude réalisée en Jordanie montre que, chez des animaux recevant des aliments contenant de 0,2 à 5,8 µg d'AFB1/kg, 25% des œufs produits contiennent la toxine à l'état résiduel (Herzallah, 2009).

2.6. Stratégies de lutte contre les aflatoxines

La contamination des aliments et matières premières destinées à l'alimentation des hommes et des animaux par les aflatoxines pose donc de nombreux problèmes de santé publique mais est aussi responsable de pertes économiques (Williams *et al.*, 2004 ; Charmley *et al.*, 1995).

Plusieurs stratégies de lutte peuvent être mises en œuvre pour lutter contre cette contamination. Elles vont se situer à différents niveaux : en amont de la contamination mycotoxique, en prévenant le développement fongique, au cours de ce développement ou en aval, après la production des toxines.

2.6.1. En amont : Amélioration des pratiques agricoles

Les bonnes pratiques agricoles (BPA) représentent la première ligne de défense contre la contamination des aliments. Un certain nombre de ces pratiques sont susceptibles de moduler la contamination fongique des végétaux et donc prévenir/limiter la contamination mycotoxique : surveillance météorologique, (FAO/OMS, 2011), sélection variétale, période d'ensemencement, rotation des cultures, travail des sols, irrigation et modalités de fertilisation, lutte contre les insectes (Riley et Norred, 1999). Ainsi, l'Union Européenne a publié des recommandations concernant les mesures susceptibles d'être mises en place afin de limiter la contamination des céréales par les toxines de *Fusarium*. Cependant, ces pratiques ne permettent pas, à elles seules, de contrôler complètement la contamination fongique des matières premières végétales et la présence des mycotoxines dans les productions. Ce constat est en grande partie lié à l'influence majeure des conditions climatiques, qui ne peuvent être complètement contrôlées (FAO, 2011).

2.6.2. Action pendant le développement fongique

La lutte directe contre le développement fongique pendant la croissance des végétaux ou ensuite lors du stockage des productions est la plus développée. Cette approche peut répondre à deux objectifs : limiter la croissance fongique ou détruire les moisissures présentes. Pour cela, deux stratégies sont utilisées : la première est basée sur la sélection/production de variétés résistantes au développement fongique, la seconde repose sur l'utilisation de molécules inhibant le développement fongique ou les facteurs favorisant son développement (insectes).

Une troisième approche peut aussi être développée : elle repose sur le développement d'une compétition entre les espèces fongiques toxigènes et d'autres micro-organismes.

2.6.2.1. Sélection des variétés résistantes/développement d'OGM

La sélection de variétés résistantes au développement fongique concerne principalement les moisissures phytopathogènes. En effet, pour ces espèces, telle *F. graminearum*, il existe une corrélation relative entre le degré d'attaque des plantes par les moisissures et la contamination mycotoxique (Snijders, 2004 ; Yuen et Schonenweis, 2007). Pour les espèces non phytopathogènes, la sélection/le développement de variétés résistantes aux insectes ravageurs permet de limiter la contamination fongique des végétaux et, par là, la production de mycotoxines. En effet, les blessures générées par les insectes foreurs tels que la pyrale sont des portes d'entrée pouvant être utilisées par le mycélium fongique pour accéder plus facilement aux nutriments présents à l'intérieur des grains. Les attaques d'insectes représentent donc une source indirecte de contamination mycotoxique (Flannigan et Hui, 1976). *Bacillus thuringiensis* est une bactérie qui produit de nombreuses protéines insecticides. Elle a été utilisée pour créer des variétés de maïs transgénique couramment appelé maïs Bt (Ibargutxi *et al.*, 2006 ; Abbas *et al.*, 2008). Ce dernier représente un moyen indirect de réduire la contamination mycotoxique de cette céréale, en particulier vis à vis des fumonisines (Hammond *et al.*, 2004).

Ces stratégies ont néanmoins plusieurs limites : la sélection variétale ne permet pas de développer des résistances totales, et se montre peu efficace vis-à-vis d'espèces non phytopathogènes, dont font partie les espèces d'*Aspergillus* productrices d'aflatoxines, pour lesquelles il est difficile de trouver des variétés résistantes puisque l'attaque fongique est alors souvent opportuniste.

Par ailleurs, cette stratégie rencontre aussi une forte défiance de la part des consommateurs. En France, l'utilisation des OGM est interdite à l'heure actuelle.

2.6.2.2. Utilisation des fongicides et des pesticides

L'emploi des antifongiques et des insecticides est reconnu depuis de nombreuses années comme moyen de lutte contre la présence de mycotoxines dans les aliments : les antifongiques, en inhibant la multiplication des moisissures, les insecticides, en maintenant l'intégrité des protections naturelles des grains (Draughon et Ayres, 1981). Bien que ces composés doivent subir pour leur autorisation d'usage une lourde procédure d'homologation, de nombreuses molécules fongicides et insecticides vont être interdites dans les années à venir (plan ecophyto 2018) : 30 molécules ont été retirées fin 2008 (dont 11 fongicides), 10 molécules ont été retirées fin 2010 (dont 6 fongicides) et 13 molécules l'ont été fin 2012 (dont 3 fongicides). L'objectif affiché par les pouvoirs publics est la diminution de 50% de l'usage des pesticides d'ici 6 ans.

Aussi, il apparaît maintenant important de développer des stratégies alternatives à cette lutte chimique. L'identification de nouveaux composés, d'origine naturelle, pourrait représenter une alternative intéressante pour lutter contre la contamination mycotoxique des aliments (voir plus loin).

2.6.2.3. Utilisation des souches non toxigènes (atoxigéniques).

Une stratégie alternative de lutte contre le développement de souches fongiques aflatoxinogènes a été initiée au début des années 2000. Elle repose sur la mise en compétition des souches toxigènes avec des souches non toxigènes sélectionnées. Ces souches atoxigéniques ne produisent pas certaines enzymes de la voie de biosynthèse mais sont en mesure de coloniser les substrats d'intérêt et de limiter, par compétition, la croissance des souches toxigènes, limitant de ce fait la

contamination par les aflatoxines. Plusieurs études ont montré que cette approche pouvait permettre une réduction de la contamination par les aflatoxines au champ ou au cours du stockage.

La lutte biologique peut limiter ou réduire la production des aflatoxines au champ pendant le développement végétal et les résultats des principales études disponibles sont récapitulés dans le tableau 15. C'est Cotty qui a initialement montré l'efficacité d'une souche atoxinogène d'*Aspergillus flavus* pour réduire le niveau de contamination final par l'aflatoxine B1 du coton en Arizona (Cotty, 1990). Après 4 années d'études sur champ de maïs, les résultats ont montré que la compétition entre deux souches non-aflatoxinogéniques d'*A.flavus* et une souche toxino-gène d'*A.flavus*, permettait d'obtenir une réduction du niveau de contamination par les aflatoxines.

Plusieurs chercheurs ont étudié l'utilisation possible d'une souche atoxinogène d'*Aspergillus flavus* sur l'arachide comme outil pour réduire ou limiter le niveau de contamination de ces matières premières par les aflatoxines au champ avant la récolte ou ensuite pendant le stockage. Les résultats ont montré que le traitement du sol avec deux souches atoxinogène d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus parasiticus* réduit le niveau de contamination par les aflatoxines avant la récolte et pendant le stockage (Dorner et Cole, 2002). Par contre, l'application de conidies des souches atoxinogènes directement sur les arachides avant le stockage n'apparaît pas efficace pour réduire la contamination par les aflatoxines pendant cette période.

Ces stratégies ont néanmoins, elles aussi, plusieurs limites :

- L'utilisation de souches atoxinogènes au champ ne permet pas d'inhiber ou de limiter la contamination par les aflatoxines sur une longue période.
- Les souches atoxinogène d'*A. flavus* peuvent, après développement sur les cultures, comme les arachides ou le maïs, redevenir des souches toxino-gènes par recombinaison avec des souches toxino-gènes (Fisher et Henk, 2012).
- La caractérisation génétique de ces souches de bio-contrôle n'est pas encore complète (Olarte et al., 2012).

Tableau 15 : Effet de souche atoxinogène sur la réduction de la contamination par les aflatoxines

Souche toxino­gène et atoxino­gène	Substrat	Méthode d'inoculation	% de réduction de la contamination	Références
CT3+F3W4	Maïs-grain (2001,2002)	Inoculation artificielle (technique pin-bar)	60 ¹	(Abbas <i>et al.</i> , 2006)
K49+ F3W4	Maïs-grain (2001,2002)		74 ¹	
CT3	Maïs-grain (2001,2002)		87 ²	
K49	Maïs-grain (2001,2002)		58 ²	
<i>Aspergillus flavus</i> atoxino­gène	Maïs avant récolte	Application par pulvérisation de spores sur une plaie	76 - 81 ²	(Brown <i>et al.</i> , 1991)
11 souches atoxino­gènes et une toxino­gène	Maïs (au laboratoire et au champ)	Application par pulvérisation de spores	70 – 99,9 ¹	(Atehnkeng <i>et al.</i> , 2008).

1 Niveau de réduction par rapport au contrôle inoculé par une souche toxino­gène

2 Niveau de réduction par rapport au contrôle non inoculé

2.6.3. En aval : décontamination des matières premières

Une dernière approche de lutte contre les mycotoxines consiste à limiter leur impact toxique après production par la moisissure. Trois stratégies principales ont été développées : le tri sélectif, la détoxification chimique et le contrôle du devenir et/ou des effets.

2.6.3.1. Tri sélectif

Le tri sélectif des productions les plus contaminées (au niveau des lots de matière première, des grains, voire des fractions de grains) permet souvent une diminution de la contamination mycotoxique (Riley et Norred, 1999).

Cette méthode a toutefois de nombreuses limites : efficacité modérée, production de « sous-produits » plus contaminés que les produits de départ.

2.6.3.2. Détoxification

De nombreuses études ont évalué la capacité des substances chimiques et traitements physiques à inactiver ou réduire les niveaux de contamination par les aflatoxines.

2.6.3.2.1. Dénaturation physique

Les aflatoxines sont très stables à la chaleur et ne sont inactivées qu'après chauffage à une température allant de 237°C à 306°C (Rustom, 1997). Par conséquent, l'application de traitements thermiques capables de réduire la contamination mycotoxique entraînerait aussi une réduction significative de la valeur nutritive des matières premières (Chaudhary et Chaudhary, 2012).

2.6.3.2.2. Dénaturation chimique

La destruction de la mycotoxine par application d'un traitement chimique est possible dans un certain nombre de cas.

L'ammonisation est la méthode chimique qui peut être utilisée pour réduire la teneur en aflatoxines dans les aliments. Les paramètres importants sont le temps de réaction, la température, la pression et la combinaison avec du formaldéhyde. La dégradation de l'AFB1 par l'ammoniac se produit à la suite de l'hydrolyse de la fonction lactone, suivie d'une décarboxylation. La molécule mère est alors convertie en un composé non toxique : l'aflatoxine D1 (figure 14). Ce dernier est en effet 130 à 20 000 fois moins toxique que la molécule mère (AFB1) (Piva *et al.*, 1995). L'hydroxyde d'ammonium est très efficace pour réduire la teneur en aflatoxines dans le maïs et l'arachide. Les résultats ont montré une réduction de 99% du niveau de contamination par les aflatoxines (Dollear *et al.*, 1968 ; Brekke *et al.*, 1977).

Cependant, ces pratiques ont également leurs limites : les traitements mis en œuvre doivent être spécifiques des propriétés structurales des composés à dénaturer. De plus, la décontamination des matières premières destinées à la consommation humaine est interdite.

Couramment utilisés dans les années 80-90 pour détoxifier les tourteaux d'arachides importés en Europe et destinés à l'alimentation animale, ces procédés sont désormais moins utilisés en pratique.

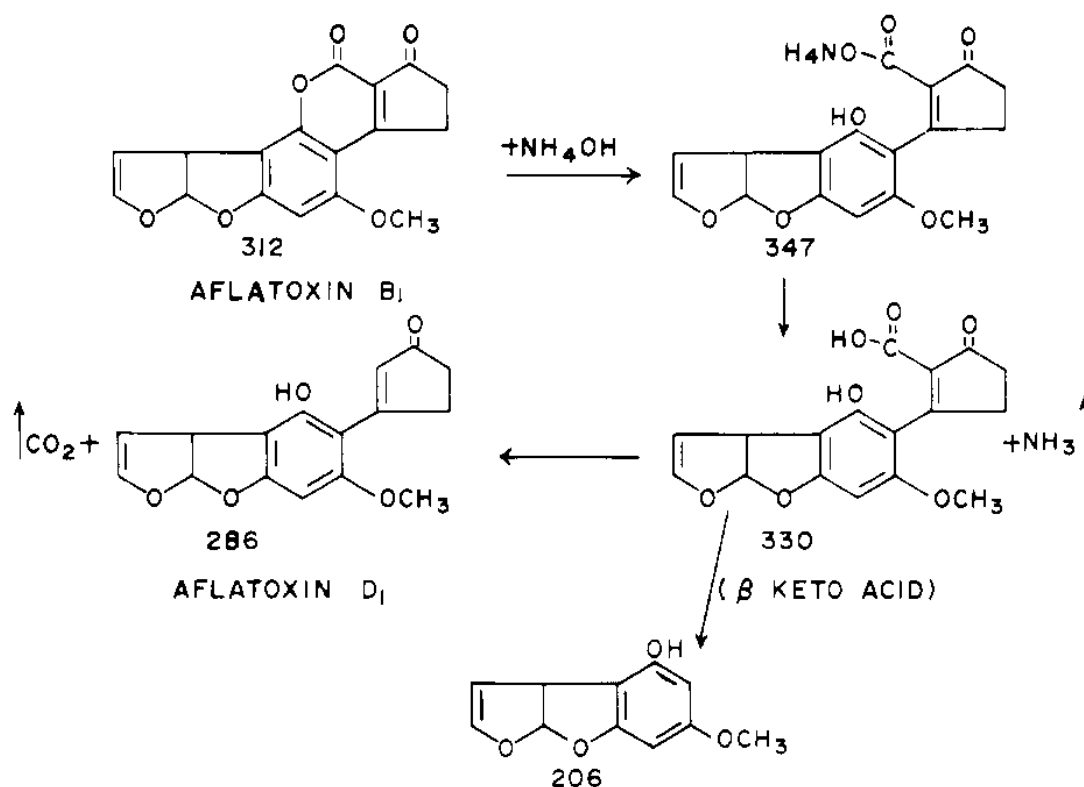


Figure 14 : Détoxification de l'AFB₁ par ammoniation

2.6.3.2.3. Molécules adsorbantes et anti-toxiques

Certains produits possèdent des propriétés d'adsorption et peuvent être utilisés dans des procédés de détoxification des aliments contaminés par les mycotoxines. Ils permettent de réduire la biodisponibilité des contaminants et leur absorption intestinale (Galvano *et al.*, 2001).

Ces molécules sont des charbons actifs (AC), des argiles telles que les aluminosilicates de sodium (HSCAS), les zéolites ou les bentonites. Ce sont les adsorbants les plus étudiés et leur affinité pour l'AFB₁ a été démontrée (Ramos *et al.*, 1996 ; Huwig *et al.*, 2001). Ils sont susceptibles de bloquer les toxines dans le tube digestif des animaux ou de renforcer les défenses et la résistance naturelle de l'organisme, limitant, ainsi l'impact délétère des mycotoxines.

➤ Bentonites

Les bentonites sont créées à partir de l'altération de cendres volcaniques. Les bentonites sont utilisées dans la clarification de boissons et la décoloration des huiles. (Ramos *et al.*, 1996). La capacité d'adsorption des bentonites dépend principalement des cations interchangeables (Na^+ , K^+ , Ca^{++} et Mg^{++}) présents dans les molécules (Galvano *et al.*, 2001).

Les études ont démontré que l'ajout de bentonite à l'alimentation des poissons contaminés par AFB1 entraîne une réduction de 80% des résidus d'AFB1 dans le foie et les reins des animaux traités par rapport aux témoins (Ellis *et al.*, 2000). Une autre étude a montré une réduction de 65% de l'excrétion de l'AFM1 dans le lait de chèvre (Rao et Chopra, 2001).

➤ Aluminosilicate de sodium (HSCAS)

Le HSCAS est une montmorillonite de calcium d'origine naturelle qui est couramment utilisée comme additif anti-agglomérant dans les aliments pour animaux (Wang *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont montré que le HSCAS est l'adsorbant le plus efficace pour lutter contre les aflatoxines. Voici quelques exemples d'études réalisées avec ce composé.

- L'ajout de 0,5% de HSCAS à un aliment contenant 0,75 mg/kg d'AFB1 entraîne une réduction significative de l'excrétion d'AFM1 dans l'urine chez les dindonneaux (Edrington *et al.*, 1996).
- Le HSCAS apparaît aussi efficace pour réduire l'excrétion lactée de l'AFM1 chez la vache laitière (Galvano *et al.*, 1996). De même, il a été montré que l'utilisation de 0,5% de HSCAS entraîne une réduction significative de la quantité d'AFM1 retrouvée dans l'urine de rats (Sarr *et al.*, 1995).

Une étude menée chez l'homme a montré que l'utilisation de ce composé (NovasilND) entraîne une réduction de plus de 40% des adduits sériques AFB1-albumine et une réduction de 58% de l'excrétion d'AFM1 dans l'urine après trois mois du traitement

(Wang *et al.*, 2008). De plus, le NovasilND n'interfère pas avec les niveaux sériques de vitamines A et E, de fer et de zinc.

➤ Les parois de levures

Des nouveaux types d'agents adsorbants ont été plus récemment développés. Ces molécules sont issues de parois de levure du genre *Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats des essais réalisés *in vitro* ont fait l'objet de différentes publications et ont montré que les parois de levures sont capables de capter les aflatoxines et de limiter leur absorption intestinale (Yiannikouris *et al.*, 2006; Kabak *et al.*, 2006).

Cependant, des études récentes montrent que cette capacité d'adsorption peut fortement varier en fonction du substrat et qu'il peut exister de fortes interactions avec la matrice. Ainsi, la capacité de fixation de l'aflatoxine B1 présente dans du maïs est beaucoup plus faible que celle observée lors des tests *in vitro* (Pereyra *et al.*, 2013).

Outre une efficacité qui apparaît donc très variable selon les composés, ces traitements occasionnent un surcoût important pour les éleveurs.

Toutes ces stratégies « classiques » de lutte contre la contamination des aliments par les aflatoxines ont donc des limites et ne peuvent permettre d'assurer, dans tous les cas, l'absence de mycotoxine. Compte tenu de la toxicité de l'AFB1 (agent génotoxique), il est crucial de limiter autant que possible l'exposition des consommateurs et, par conséquent, il apparaît nécessaire d'identifier d'autres moyens de lutte contre cette mycotoxine qui pourraient venir renforcer l'efficacité des mesures déjà existantes.

L'une de ces stratégies consiste à identifier des composés capables de bloquer la biosynthèse de la mycotoxine.

2.6.4. Stratégie alternative de lutte contre l'AFB1 par modulation négative de la synthèse

La lutte contre la contamination des aliments par les aflatoxines peut aussi être basée sur l'identification des molécules capables d'inhiber spécifiquement la production de ces toxines. L'intérêt de cette approche est de permettre une diminution du risque sanitaire en limitant la contamination finale des aliments sans modifier l'équilibre de la microflore et de sa biodiversité.

Plusieurs études ont visé à identifier des molécules capables d'inhiber directement la synthèse des aflatoxines. En général, ces molécules inhibitrices agissent à trois niveaux différents :

- Par modification de l'environnement immédiat de la moisissure,
- En interférant avec les signaux régulateurs en amont de la biosynthèse,
- En bloquant l'activité de certaines enzymes de la voie de biosynthèse.

2.6.4.1. Changement de l'environnement de la moisissure

Des molécules d'origine naturelle sont susceptibles d'inhiber la synthèse de l'aflatoxine B1.

Elles appartiennent à des familles chimiques variées puisqu'on trouve des composés phénoliques, des alcaloïdes, des terpènes. La nature et le mode d'action identifié de ces molécules actives sont récapitulés dans le tableau 16. Ces composés agissent en général très précocement en modifiant l'environnement du champignon ou en modulant le stress oxydant. Ainsi, l'eugénol et l'éthylène sont capables de moduler négativement la synthèse d'AFB1 (Holmes *et al.*, 2008). Cette action semble directement liée au pouvoir antioxydant de ces composés. Il se traduit par une diminution de la peroxydation lipidique et une diminution concomitante de l'activité des enzymes impliquées dans la détoxification cellulaire comme la superoxyde dismutase ou la glutathion peroxydase (Huang *et al.*, 2009; Jayashree et Subramanyam, 1999). Ce pouvoir antioxydant entraîne en parallèle une diminution

de la quantité de NADPH présente dans le milieu et nécessaire à de nombreuses étapes de synthèse d'AFB1.

2.6.4.2. Interférence avec les signaux régulateurs

Certaines molécules sont capables d'inhiber la synthèse des aflatoxines en agissant sur les gènes impliqués dans la régulation de la voie de biosynthèse. Ainsi, par exemple, le méthyl-syringate est capable de réduire le niveau d'expression des gènes *pksA*, *omtA* et *aflR* chez *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*, induisant ainsi l'inhibition de la synthèse de l'AFB1 (Jermnak *et al.*, 2012) (tableau 16).

Tableau 16 : Molécules inhibant la synthèse d'AFB1 par modification de l'environnement ou interférant avec la régulation de la voie de biosynthèse

Composé actif	Famille	Dose	% inhibition		Mécanisme d'action	Référence
			AFB1	croissance		
Eugénol	Composés phénoliques	75µg/ml	50	0	Effet antioxydant ↓ SOD	(Jayashree et Subramanyam, 1999)
Vanillyl acétone		20mM	99%	40%	↓ de la respiration mitochondriale	(Kim <i>et al.</i> , 2004)
Caféine	Alcaloïdes	2mg/ml	50	91	↓ l'absorption des hydrates de carbone	(Buchanan <i>et al.</i> , 1983)
α-β carotènes	Terpénoïde	0,032µg/ml	47	30	↓ (NOR) ↓ d'expression des gènes	(Norton, 1997) (Holmes <i>et al.</i> , 2008)
Acide gallique		0, 2mg/ml	96	0	↓ gènes (nor1 et ver1) Légèrement effet <i>aflR</i>	(Cary <i>et al.</i> , 2003)
Méthyl syringate		0,8 mM 4 mM	50 100	≈ 14 ≈ 18	↓ (NOR) ↓(<i>PKS</i> , <i>omtA</i> et <i>aflR</i>)	(Jermnak <i>et al.</i> , 2012).
5-Azacytidine		1 mM	100	5	↓(<i>aflP</i>)	(Lin <i>et al.</i> , 2012)

↓ inhibition

2.6.4.3. Blocage des enzymes de la voie de biosynthèse.

Certaines molécules naturelles peuvent bloquer le fonctionnement de certaines enzymes impliquées dans la synthèse et donc empêcher la formation d'aflatoxines (Tableau 17).

C'est le cas du dillapiol, extrait de l'huile d'aneth, et du spiroether, extrait de l'huile de camomille, qui inhibent la synthèse d'AFG1 sans affecter la production d'AFB1 ni le développement fongique. Ces molécules agissent sur l'enzyme

responsable de la conversion de l'OMST en AFG1 (Razzaghi *et al.*, 2007 ; Yoshinari *et al.*, 2008). Une étude menée par Cai *et al.*, en 2008, a montré que cette dernière étape dans la synthèse de l'AFG1 est liée à l'action d'une enzyme nommée NADA (Cai *et al.*, 2008).

Tableau 17 : Molécules inhibant des enzymes de la voie de biosynthèse

Composé actif	Origine	Dose	% inhibition			Mécanisme d'action	Référence
			AFB1	AFG1	croissance		
Dillapiol	huile d'aneth	64µM	0	98	0	Inhibition de la transformation OMST en AFG1	(Razzaghi et al., 2007)
E.spiroether	huile de camomille	30µM	0	98	0	Inhibition de la transformation OMST en AFG1	(Yoshinari et al., 2008)

2.6.4.4. Molécules dont le mécanisme d'action n'est pas identifié.

Enfin, d'autres molécules ont été identifiées comme susceptibles de moduler négativement la synthèse d'AFB1 mais cependant leur mécanisme d'action exact n'a pas encore été identifié. Ces composés sont récapitulés dans le tableau 18. Pour ces composés, il convient de souligner qu'ils entraînent une inhibition de la synthèse d'AFB1 associée à une réduction de la croissance fongique. Par conséquent, il est probable qu'ils agissent soit en perturbant l'environnement du champignon, soit en interférant avec des processus métaboliques globaux, non spécifiques de la synthèse de mycotoxine.

Tableau 18 : molécules inhibant la synthèse d'aflatoxine dont le mécanisme d'action n'est pas connu.

Composé actif	Famille	Dose	% inhibition		Référence
			AFB1	croissance	
Pipérine	Alcaloïdes	0,7%	75	40	(Lee <i>et al.</i> , 2002)
		1000µg/ml	96	55	(Madhyastha <i>et al.</i> , 1984)
Piperlongumine		0,2%	96	15,1	(Lee <i>et al.</i> , 2002)
Acide férulique	Composés phénoliques	(0,2mg/ml)	50	30	(Chipley et Uraih, 1980)

3. Conclusion

De nombreux composés sont donc susceptibles de moduler négativement la synthèse d'aflatoxine B1 et de représenter ainsi une stratégie alternative intéressante de lutte contre la contamination des aliments par cette toxine.

Cependant, l'utilisation pratique de ces composés est souvent rendue difficile par leur toxicité propre. De plus, la majorité d'entre eux agissent en parallèle sur la croissance fongique, ce qui pose le problème de leur impact sur la biodiversité et sur l'émergence éventuelle de nouveaux contaminants en lieu et place de ceux qui ont été inhibés.

Notre projet a donc visé à identifier de nouveaux composés susceptibles d'inhiber spécifiquement la synthèse d'aflatoxine B1 sans moduler la croissance fongique. Nous souhaitons plus spécifiquement focaliser nos recherches sur des composés d'origine naturelle, dont l'utilisation semble plus facilement compatible avec des pratiques agricoles durables.

Afin d'identifier des molécules candidates, notre démarche a consisté à étudier la qualité fongique et mycotoxique de différentes matières premières. En effet, la mise en évidence d'une contamination par des souches toxigènes d'un substrat sans qu'il n'y ait contamination mycotoxique peut laisser supposer que le substrat en question est capable d'interférer avec la biosynthèse de la toxine.

Dans ce cadre, nous nous sommes attachés, dans un premier temps, à caractériser la flore fongique et la contamination mycotoxiques de certaines épices.

Deuxième Partie

Qualité fongique et mycotoxique d'épices commercialisées au Maroc

1. Introduction- contexte de l'étude

Parmi les produits sensibles à la contamination par l'AFB1, on trouve les épices. En effet, ces ingrédients sont largement produits dans des zones où le climat est très favorable à la croissance fongique et à la toxinogénèse. De plus, le process de fabrication après récolte (séchage au soleil, manipulation, stockage) est souvent lui aussi favorable à une contamination secondaire et au développement des moisissures.

Des études antérieures ont montré que les épices pouvaient être contaminées par des mycotoxines et représenter ainsi une source directe d'exposition des consommateurs (El Shafie *et al.*, 2002 ; Fazekas *et al.*, 2000). Pour cette raison, il existe des réglementations spécifiques concernant les teneurs tolérables en certaines mycotoxines dans ces aliments. Ainsi, en Europe, la réglementation fixe une teneur maximale tolérable en AFB1 à 5 µg/kg pour les épices.

Cependant, l'analyse de la bibliographie montre aussi que les niveaux de contamination mycotoxique sont très variables d'une épice à l'autre. Ainsi, si le paprika apparaît souvent très contaminé, d'autres épices comme le poivre, le sont beaucoup moins (Martins *et al.*, 2001 ; O' Riordan et Wilkinson, 2008 ; O'Riordan *et al.*, 2008 ; Ozbey *et al.*, 2012, Zinedine *et al.*, 2006). Ce constat peut être relié aux étapes de production qui peuvent varier (importance du séchage) mais aussi, peut-être, à la composition des épices et à la présence, dans certaines d'entre elles, de substances capables de limiter la synthèse des mycotoxines.

Dans ce contexte, notre étude avait pour objectifs de:

- caractériser la flore fongique d'épices largement utilisées dans le monde et au Maroc
- de caractériser le potentiel toxinogène des souches d'*Aspergillus* de la section *Flavi* isolées à partir des échantillons
- de corrélérer ce potentiel avec la contamination mycotoxique observée dans les épices
- d'identifier des épices « résistantes » à la contamination mycotoxique et susceptibles de contenir des molécules inhibitrices de la toxinogénèse fongique.

2. Distribution et toxinogénicité des *Aspergillus* de la section *Flavi* dans les épices commercialisées au Maroc

El. Mahgubi *et al.* Food Control, 32, 143-148, 2013.



Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco

A. El Mahgubi^{a,b}, O. Puel^{a,c}, S. Bailly^{a,b}, S. Tadrict^{a,c}, A. Querin^{a,b}, A. Ouadia^d, I.P. Oswald^{a,c}, J.D. Bailly^{a,b,*}

^a INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France

^b Université de Toulouse, ENVT, INP, Toxalim, F-31076 Toulouse, France

^c Université de Toulouse, INP, UMR1331, Toxalim, F-31000 Toulouse, France

^d Faculté des Sciences et techniques Guéliz, Université Cadi Ayyad, 40000 Marrakech, Morocco

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 August 2012

Received in revised form

23 October 2012

Accepted 3 November 2012

Keywords:

Spices

Aspergillus flavus

Aspergillus minisclerotigenes

Aflatoxin B1

Mycotoxin production

Chemotype

ABSTRACT

Aflatoxin B1 is a carcinogenic mycotoxin that may contaminate spices. Indeed, these ingredients are usually produced in areas where the climatic conditions are favorable to growth of *Aspergillus* of the *Flavi* section and the synthesis of mycotoxins. This study aimed to characterize the fungal flora of 80 paprika, cumin and pepper marketed in Morocco with a special focus on *Aspergillus* section *Flavi* isolates. After identification to the species level, their toxigenic potential was determined and the related contamination of spice samples was also investigated.

We observed a widespread contamination of spices with *Aspergilli* section *Flavi*. Among them, 57% were found to be toxigenic. The most frequent chemotypes correspond to isolates able to produce both aflatoxin B and cyclopiazonic acid followed by B aflatoxins only producers. These chemotypes represented 25% and 16% of the isolates respectively. Eight percent of toxigenic isolates (3/36), that produced sclerotia in culture, were found able to synthesis aflatoxin G1. A molecular identification revealed that these isolates belonged to *Aspergillus minisclerotigenes* species. That is the first report of the presence of such species in spices.

The analysis of the contamination of spice samples with AFB1 revealed that paprika is frequently contaminated since 95% were contaminated with that mycotoxin and 40% of samples exceeded European regulation for that contaminant. Therefore, this spice that is widely used for cooking in Morocco, may represent a direct source of exposure to that carcinogenic compound.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Uncontrolled development of molds on agricultural commodities is of great importance since it may lead to a decrease in organoleptic and/or nutritional qualities. About 5–10% of agricultural products may be lost or withdrawn from human or animal consumption due to mold spoilage (Cook & Johnson, 2010).

Mold development can also lead to the production and accumulation of toxic compounds called mycotoxins without any visible alteration of the substrate. Due to very active and diverse secondary metabolism of molds, hundreds of different toxins have been identified among which about 30 are considered of real importance

for human and animal health (Bennett & Klich, 2003). The most toxic and dangerous mycotoxins are aflatoxins. Indeed, aflatoxin B1 (AFB1) is the most potent hepatic carcinogen known in mammals and is classified by the International Agency for Research on Cancer in the group of molecules that are carcinogenic for both human and animals (group 1, I.A.R.C., 1993; Liu & Wu, 2010). Aflatoxins also display immunosuppressive properties (Bondy & Pestka, 2000; Meisssonier et al., 2008) and they are involved in growth impairment in children (Khlangwiset, Shephard, & Wu, 2011). Due to their toxicity, more than one hundred countries set up regulations for aflatoxins in foods and feeds (European Union, 2006; FAO, 2003).

Aflatoxins are produced by fungi that belong to *Aspergillus* genus and especially by *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus nomius* (Cary & Ehrlich, 2006). These fungal species are worldwide contaminants of many foods and agricultural products. However, due to hydrothermal conditions that are required for their production, aflatoxins are usually considered as major

* Corresponding author. Université de Toulouse, ENVT, INP, Toxalim, 23 chemin des capelles, F-31076 Toulouse, France. Tel.: +33 561 193 229; fax: +33 561 491 263. E-mail address: jd.bailly@envt.fr (J.D. Bailly).

contaminants mainly in geographic areas displaying tropical or sub-tropical climate (Cotty & Jaime-Garcia, 2007; Sanchis & Magan, 2004).

Among sensitive products for aflatoxin contamination, spices appear of special interest. Indeed, they are mainly produced in areas where both temperature and humidity are favorable to fungal development and subsequent toxinogenesis. Processing methods used after harvest (sun drying, handling, storage) can also allow secondary mold contamination and development (Kneifel & Berger, 1994; Mandeel, 2005). Previous studies demonstrated that spices can be contaminated by mycotoxins and thus represent a direct source of exposure for consumers (Elshafie, Al Rashdi, Al Bahry, & Bakheit, 2002; Fazekas, Tar, & Kovacs, 2005; Freire, Kozakiewicz, & Paterson, 2000). That is why spices are specifically concerned by regulations on aflatoxins. For instance, E.U. regulation has been set at 10 µg/kg for total aflatoxins and 5 µg/kg for AFB1 (E.U., 2006).

Spices production is of special importance for Morocco. Indeed, spices such as pepper, paprika or cumin are extensively used for flavoring foods as well as for medication. Spices are also exported worldwide and especially toward European Union and consequently, spices represent an important income for this country. Despite this local importance, no data are available on mycological quality of spices marketed in Morocco and only one study has investigated mycotoxin contamination in this commodity (Zinedine et al., 2006).

The aims of this study were i) to characterize the fungal flora of widely used spices marketed in Morocco with special attention to *Aspergillus*, ii) to characterize the toxigenic potential of *Aspergillus* section *Flavi* isolates obtained from spices and to correlate it with the aflatoxin B1 contamination.

2. Material and methods

2.1. Solvents and reagents

All reagents including solvents were purchased from VWR International (Fontenay sous bois, France) and were of analytical grade. Mycotoxins standards (aflatoxin B1, B2, G1 and G2, cyclopiazonic acid) were purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Aflatoxins were dissolved in toluene–acetonitrile (98:2) and cyclopiazonic acid in methanol to obtain 1 mg/ml stock solutions that were stored at –20 °C. Taq DNA polymerase used for molecular identification was purchased from Invitrogen (Carlsbad, Ca, USA).

2.2. Sampling

Spices were chosen on the basis of their availability on the market and popularity of usage. 80 samples were randomly collected from several retailers in different districts of Marrakech city (Medina, Gueliz, Mollah). Analyzed samples included cumin ($n = 20$), paprika ($n = 20$), black ($n = 20$) and white ($n = 20$) pepper. All samples were of “commercial grade” and no macroscopically moldy spice was included in the sampling plan. Spices were usually stored outside, in metal or plastic containers without any particular protection. For each sample, a minimum of three sub-samples were taken and mixed to prepare a composite sample of about 500 g. These composite samples were kept in sterile polypropylene boxes at 4 °C until analysis. In the laboratory, samples present as grains (pepper and cumin) were finely grounded using a Waring blender (Waring Laboratory, Torrington, CT, USA).

2.3. Fungal count and identification

20 g of sample were dispersed in 180 ml of 0.05% Tween 80 solution using a Waring blender mixer. 100 µl of each decimal

dilution were plated on both malt extract agar medium (MEA) (2% agar, 2% malt, 50 ppm chloramphenicol) and NaCl added malt agar medium (MEA + 6% NaCl). Typical fungal colonies were counted after 3, 5 and 7 days of culture at 25 and 30 °C. They were then identified according to Von Arx (1981) and Samson, Houbraeken, Thrane, Frisvad, and Andersen (2010). *Aspergillus* section *Flavi* strains were isolated from plates by several planting out on both malt agar and Czapek medium.

2.4. Characterisation of *Aspergillus* section *Flavi* isolates

2.4.1. Mycotoxigenic potential of the isolates

Toxigenic potential of *Aspergillus* strains was determined after culture on Yeast Extract Sucrose (YES) (2% yeast extract, 16% sucrose) medium for 15 days at 30 °C. Toxins were then extracted from culture medium by mechanical agitation in appropriate solvent. Extract was filtered, and the toxins were separated by thin layer chromatography. After plate drying, toxins were quantified by fluorodensitometry using a Shimadzu CS930 fluorodensitometer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Quantification was done by comparison with known amounts of standard spotted on the same plate.

- Aflatoxins were extracted by chloroform. After filtration on phase separation filter, extracts were evaporated and dissolved in toluene–acetonitrile (98:2) and separated by migration on TLC plates in Ether–methanol–water (96:3:1, vol/vol/vol). They were quantified by fluorimetry at 365 nm (Shotwell, Burg, & Diller, 1981). Limit of quantification: 5 ng/g.
- Cyclopiazonic acid (CPA) was quantified as already described by Landsen (1986). Briefly, after acidification, culture medium was extracted by methanol–chloroform (1:1, vol/vol), filtered on phase separator filters, evaporated to dryness and dissolved in methanol. Development system used was ethyl acetate/isopropanol/ammoniac (20:15:10). After a drying step, cyclopiazonic acid was revealed on plates by spraying a 10% para-dimethylaminobenzaldehyde solution in acetone (1:3). Quantification was done at 600 nm. Limit of quantification: 200 ng/g in the culture medium.

Based on their toxigenic potential (AFB+/–, AFG+/–; CPA+/–), isolates were classified in 5 chemotypes: chemotype I for AFB and CPA producers; chemotype II for AFB, AFG and CPA producers; chemotype III for AFB only producers; chemotype IV for CPA only producers and chemotype V for non mycotoxin producers (Vaamonde, Patriarca, Fernandez Pinto, Comerio, & Degrossi, 2003).

2.4.2. Morphological identification

Aspergillus section *Flavi* strains were identified at the species level by both macroscopic and microscopic examination after 5 and 7 days of culture at 25 °C on both malt agar and Czapek medium according to Varga, Frisvad, and Samson (2011).

2.4.3. Molecular identification

The molecular identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates was performed by internal transcribed spacers (ITS) rRNA and 5.8S rRNA, partial beta-tubulin, calmodulin and mating-type genes amplification and sequencing. The strains were cultured in YES broth and placed on a shaking incubator at 200 rpm at 25 °C for 3 days. Genomic DNA was isolated from mycelia as previously described (Girardin, Latgé, Srikantha, Morrow, & Soll, 1993). Primer pairs (ITS 5 and ITS 4) and PCR conditions were those described by White, Bruns, Lee, and Taylor (1990). Beta-tubulin, calmodulin were amplified under conditions previously described by Peterson (2008) whereas mating-type genes were amplified according to

Soares, Rodrigues, Peterson, and Venancio (2012). PCR reactions were carried out in a GenAmp PCR 2700 thermocycler (Applied Biosystems, Forster City, USA). PCR products were purified with GenElute PCR clean-up kit (Sigma–Aldrich) and sequenced by the dye terminator technology on ABI3130XL sequencer (Applied Biosystems). PCR products were sequenced in both directions.

Nucleotide sequence accession numbers for internal transcribed spacers (ITS) rRNA and 5.8S rRNA, β -tubulin, calmodulin, and mating-type factor of isolates that were subjected to molecular identification are reported in Table 1.

2.5. Analysis of aflatoxin B1 contamination of spice samples

To evaluate contamination of spice samples, the extracts were purified on immunoaffinity columns (NeoColumn Aflatoxin, Neogen, Scotland). Briefly, a 25 g finely grinded sub-sample was extracted with 125 ml methanol (70%) and filtered through Whatman no. 4. 20 ml of obtained extract were added 20 ml PBS and 10 ml of the mixture were applied to the column with a flow rate of 1.5 ml/min. Column was then washed twice with methanol 25% and bound aflatoxin B1 was eluted using methanol (100%). Then, the concentration of aflatoxin B1 was determined using immunoenzymatic ELISA kits (Veratox-HS-Aflatoxin, Neogen Europe Ltd, Scotland) as recommended by the manufacturer. The optical density was read on an STATFAX densitometer at 650 nm. The limits of detection (LOD) assessed as ten fold the baseline observed with aflatoxin free samples was 0.5 μ g/kg. The limit of quantification (LOQ) was 1 μ g/kg. The recovery of the whole method applied to standards was >90% (CV < 10%). The recovery of the whole method applied to spices spiked with 2 and 20 ppb of pure aflatoxin B1 was 70 and 75% respectively (CV < 5%). All positive samples were secondary tested by HPLC using fluorescence detection according to Awe and Schranz (1981).

3. Results

3.1. Fungal contamination of spices

The first aim of this study was to evaluate fungal contamination of some spices commonly used and marketed in Morocco.

In the four tested spices, differences were observed among fungal counts (Fig. 1). Paprika was the most contaminated spice with a mean fungal count of $3.4 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^4$ CFU/g. The mean fungal counts for cumin, white and black pepper were $4 \times 10^3 \pm 2 \times 10^2$, $8 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$ and $1.1 \times 10^4 \pm 6.6 \times 10^2$ CFU/g respectively.

Table 1

Accession number of the sequences deposited at Genbank.

Isolate number	ITS	Beta-tubulin	Calmodulin	Mating type
<i>Aspergillus flavus</i>				
E13	JX456198	—	—	—
E28	JX456201	—	—	—
E36	JX456197	—	—	—
E51	JX456204	—	—	—
E54	JX456203	—	—	—
E56	JX456202	—	—	—
E71	JX456200	—	—	—
E73 NRRL 62477	JX292092	—	—	—
E75	JX456205	—	—	—
E81	JX456199	—	—	—
<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>				
E21	JX292090	JX456195	JX456196	JX456194
E44	JX292091	JX456210	JX456214	JX456216
E74	JX456193	JX456211	JX456212	JX456213

—: Not tested.

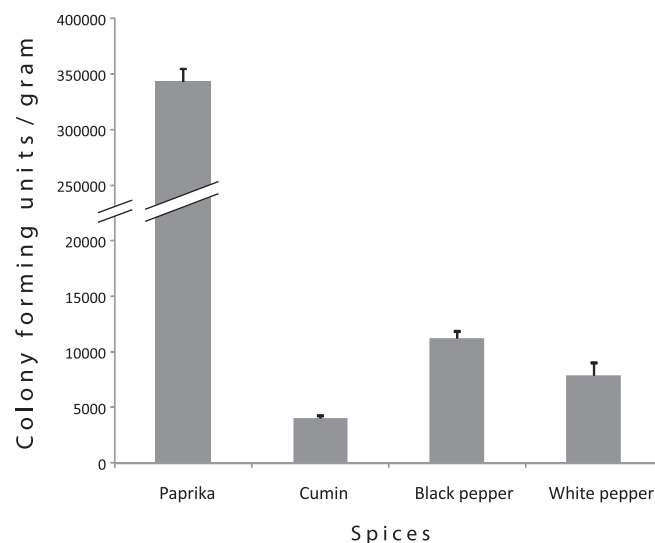


Fig. 1. Fungal contamination of spices. Results are expressed as CFU/g (mean \pm sd of 20 samples per spice).

Morphological identification of fungal species after culture on malt, salted malt and Czapek allowed the detection of 5 different genera in samples (Table 2). *Aspergillus* was the most prevalent one, representing more than 85% of the total fungal flora. With the exception of Mucorales in paprika, contamination by other fungal species was not constant and generally of low level.

Aspergillus isolates recovered from spice samples belong to nine different sections. The sections *Nigri* and *Flavi* were the most prevalent ones. Some differences could be observed between spices. For example, Cumin presented a frequent contamination with *Aspergillus* section *Fumigati*. *Eurotium* was found in all cumin and black peppers samples, whereas it was never found in paprika (Table 2). Similarly, *Aspergillus* section *Versicolores* and *Aspergillus* section *Candidi* were not present in paprika samples whereas they were found as common contaminants of others spices. Of note, paprika was contaminated by more hygrophilic species such as mucorales and, in a lesser extent, *Aspergillus* section *Terrei*.

3.2. Characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolates

Members of *Aspergillus* section *Flavi* were found in 80–100% of the samples of cumin, black pepper and paprika but only in 55% of white pepper samples (Table 2). Since the section *Flavi* consists of various species that may differ in their mycotoxin-production potential, we further analyzed isolates belonging to that section

Table 2

Fungal contamination of spices (number of contaminated samples).

	Spices			
	Paprika	Cumin	Black pepper	White pepper
<i>Aspergillus</i>				
Section <i>Flavi</i>	20/20	16/20	16/20	11/20
Section <i>Nigri</i>	20/20	19/20	19/20	10/20
Section <i>Circumdati</i>	10/20	11/20	20/20	3/20
Section <i>Fumigati</i>	1/20	19/20	9/20	2/20
Section <i>Terrei</i>	17/20	5/20	4/20	4/20
Section <i>Versicolores</i>	0/20	8/20	13/20	6/20
Section <i>Nidulantes</i>	1/20	11/20	6/20	6/20
Section <i>Candidi</i>	0/20	6/20	4/20	0/20
Section <i>Restricti</i>	0/20	0/20	6/20	0/20
<i>Eurotium</i>	0/20	20/20	20/20	16/20
<i>Penicillium</i> sp.	1/20	18/20	11/20	14/20
<i>Fusarium</i> sp.	0/20	1/20	1/20	3/20
Mucorales	20/20	17/20	17/20	3/20

for mycotoxin production. Both morphological and molecular identification of the toxigenic isolates were also performed.

3.2.1. Mycotoxin potential

All isolates belonging to *Aspergillus* section *Flavi* were tested for their ability to produce aflatoxins B and G and cyclopiazonic acid in culture media. They were classified in 5 different chemotypes according to their toxigenic potential (Table 3). 27 out of 63 isolates (43%) belonged to the chemotype V (non toxigenic strains) and 36 (57%) were found able to produce one or more toxins. Among the toxigenic isolates, 16 (25%) belonged to the chemotype I (production of AFB1, AFB2 and CPA), 10 (16%) to the chemotype III (production of AFB1 only), 7 (11%) to the chemotype IV (production of CPA only) and 3 (5%) to the chemotype II (production of AFB1, CPA and AFG1).

Almost half of the isolates (29 out of 63–46%) were able to produce AFB1 at level ranging from 5 µg/kg to more than 20,000 µg/kg. About 40% of isolates produced cyclopiazonic acid. Among them, 19 (out of 26) produced both CPA and AFB1 whereas 7 isolates produced only CPA.

Toxigenic strains producing AFB2 or AFG1 were less prevalent. Indeed 7 isolates were producing AFB2 and only 3 were found able to produce AFG1. No isolate was producing AFG₂.

3.2.2. Morphological and molecular identification

According to morphological examination of strains grown on malt and Czapek media, all these toxigenic isolates displayed macro- and microscopic features of *A. flavus*. Indeed, all isolates grown rapidly on Malt agar and produced numerous yellow green conidia. Colony texture was velutinous or floccose with tufts. Big drops of amber or hyaline exudate were often present. Reverse was generally yellow with rays. At the microscopic level, conidiophores were long and coarse. Most conidial heads were radiate and biserial with diverging chain forming spores. However, colonies also displayed small uniseriate conidial heads on aerial mycelium. Conidia were globose to subglobose and finely rough-walled. Among isolates, only 4 (6%) produced sclerotia under culture conditions and 3 of them displayed mild differences with typical *A. flavus* strains. Indeed, isolates E21, E44 and E71 presented a large amount of sclerotia in culture. These sclerotia, white at the beginning of the culture turned pinkish then black with age; they were arranged in circular zones around the inoculation point, were of relatively small size (<0.4 mm) and were covered with amber exudate droplets. Interestingly, these 3 isolates also produced both AFB1 and AFG1.

Since it is usually admitted that *A. flavus* do not produce AFG, these 3 isolates (E21, E44 and E71) were also identified at the molecular level using the ITS sequences. The two ITS sequences of the three isolates matched with the ones of *Aspergillus minisclerotigenes* and differ from those of *A. flavus* strains by only one base. In order to confirm that these isolates belong to *A. minisclerotigenes* species, fragments of β -tubulin, calmodulin and mating-type genes were amplified and sequenced. The obtained sequences (Table 1) also matched 100% with those of *A. minisclerotigenes* isolates from different geographical origins. Molecular identification, based on ITS sequences, was also performed on 10 other strains selected randomly from toxigenic strains and confirmed that all belonged to *A. flavus* species (Table 1).

3.3. Contamination of spices with Aflatoxin B1

The presence of toxigenic isolates of *A. flavus* in most of the samples could result in mycotoxin contamination of spices. It was thus of interest to determine AFB1 concentration in the different spices (Table 4). Paprika was the most frequently and heavily contaminated spice. Indeed, frequency of contamination was 95% for paprika samples whereas it was only 25% for cumin and black pepper and 10% for white pepper. Moreover, the level of

contamination of paprika samples was higher than the level of contamination of other spices. The mean contamination level of paprika sample was 8.1 ± 5.2 µg/kg and 40% of the analyzed samples exceeded the European regulation for AFB1 content in such food (10 µg/kg). No sample of cumin or pepper exceeded this threshold. The samples were also tested for their contamination by cyclopiazonic acid and all samples were below the detection limit.

4. Discussion

Due to their geographical origin and process, molds frequently contaminate spices. The presence of toxigenic species could result in: (i) a hazard for consumers; and (ii) an important limit to international trades due to the existing regulation on mycotoxin content in such ingredients in more than 100 countries (European Union, 2006; FAO, 2003). Spices are of great importance for North African countries and especially for Morocco. Such ingredients are widely used in traditional cooking but they are also exported abroad. Indeed, more than 40 thousand tons of spices are exported each year, mainly toward European Union, USA and Japan. Despite the local importance of spices for Morocco, no data are available on mycological quality of these products and only one survey describes mycotoxin contamination of marketed spices (Zinedine et al., 2006).

In this study, we characterized the fungal flora of spices marketed in Morocco with special emphasis on *Aspergillus* section *Flavi* isolates. This confirmed that fungal flora of spices was mainly made of thermopreferent species (*Aspergillus* of the section *Flavi*, *Nigri*, *Versicolores*, *Nidulans*, *Candidi*) (Le Bars & Le Bars, 1988). Fungal contamination was higher in paprika than in pepper and cumin. This could be explained by the specificity of the technological process used for each of these spices. For instance, paprika is harvested with high water content and slowly air-dried that may allow mold growth in the post harvest stage. This could explain the high prevalence of *Mucorales*, that are hygrophilic species and, by contrast with other spices, the absence of *Eurotium*. With respect to the lower contamination of white pepper, when compared to black pepper, this may be due to the removal of the pericarp to obtain the former spice. This step may reduce fungal flora by elimination of the molds present at the surface of grains and lead to a reduction of both mean CFU load and number of contaminated samples.

The identification of the fungal species revealed a high prevalence of *Aspergilli*, in the four tested spices. Nevertheless, the high prevalence of specific *Aspergillus* species in some spices may be noted. For instance, cumin was frequently contaminated with *Aspergilli* of the section *Fumigati*. Such contamination was already reported, however in a lesser extent by Elshafie et al. (2002). The high prevalence of *Aspergillus fumigatus* may be related to the structure of the grain. The numerous bristles on the surface could hinder air circulation within piles, slow down drying step and may lead to a self-heating of the spice that favors *A. fumigatus* growth (Dos Santos, Dornier, & Carreira, 2003). This contamination may be of importance for people manipulating cumin who may inhale spores of *A. fumigatus*. Indeed, this fungal species is known to induce respiratory diseases in human (Yao & Liao, 2006) and to produce numerous mycotoxins, such as trypacidin and verruculogen, that are present on spores and inhalable hyphal fragments (Gauthier et al., 2012; Khoufache et al., 2007).

Aspergillus section *Flavi* isolates obtained from spices marketed in Morocco revealed a high proportion of toxigenic strains, as already described in spices from sultana of Oman (Elshafie et al., 2002). Indeed, 49% of the isolates were toxigenic and most of them were able to produce high level of AFB1. For instance, 16 out of the 29 aflatoxigenic strains produced more than 5000 µg AFB1/ml after 2 weeks culture in YES liquid medium. The prevalence of highly toxigenic strains of *A. flavus* is of concern since, when used as ingredient, spices contaminated with toxigenic mold strains may

Table 3
Toxicogenic ability of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from spices.

Spices and isolate number	Mycotoxin production				Chemotype
	AFB1 ^b (ng/ml)	AFB2 ^b (ng/ml)	AFG1 ^b (ng/ml)	CPA ^c (µg/ml)	
<i>Paprika</i>					
E6	44	—	—	—	III
E11	3800	—	—	—	III
E12	—	—	—	—	V
E13 ^d	6696	213	—	3.5	I
E14	—	—	—	—	V
E15	—	—	—	—	V
E16	—	—	—	—	V
E71 ^d	50,360	7970	—	14.9	I
E72	29,110	2398	—	3.4	I
E73 ^{a,d}	6788	—	—	20.3	I
E74 ^{a,d}	3216	—	1059	23.2	II
E75 ^d	20,450	—	—	3.7	I
E76 ^d	17,336	—	—	4.8	I
E77	1908	—	—	21.3	I
E78	23,655	4066	—	6.2	I
E79	17,612	536	—	15	I
E80	—	—	—	—	V
E81 ^d	28,620	—	—	6.5	I
E82	—	—	—	—	V
E83	182	—	—	—	III
<i>Cumin</i>					
E17	—	—	—	—	V
E19	—	—	—	—	V
E21 ^{a,d}	10,178	—	7315	5.4	II
E22	124	—	—	—	III
E50	—	—	—	—	V
E51 ^d	34,356	14,986	—	—	III
E52	—	—	—	2.9	IV
E53	42	—	—	6.8	I
E54 ^d	31,394	874	—	6.7	I
E55	178	—	—	9.4	I
E56 ^d	34,585	—	—	7.5	I
E57	—	—	—	2.6	IV
E58	—	—	—	—	V
E59	—	—	—	—	V
E60	—	—	—	0.8	IV
E62	5667	—	—	6.9	I
<i>Black pepper</i>					
E1	—	—	—	—	V
E26	11	—	—	—	III
E29	—	—	—	—	V
E31	47	—	—	—	III
E32	—	—	—	—	V
E34	—	—	—	—	V
E36 ^d	6256	—	—	2.1	I
E37	—	—	—	—	V
E63	—	—	—	0.6	IV
E64	—	—	—	0.7	IV
E65	—	—	—	—	V
E66	—	—	—	—	V
E67	—	—	—	1.75	IV
E68	5	—	—	—	III
E69	—	—	—	—	V
E70	—	—	—	0.8	IV
<i>White pepper</i>					
E28 ^d	4182	—	—	—	III
E35	387	—	—	—	III
E38	—	—	—	—	V
E39	—	—	—	—	V
E40	—	—	—	—	V
E41	—	—	—	—	V
E42	—	—	—	—	V
E43	—	—	—	—	V
E44 ^{a,d}	6186	—	11,692	2.3	II
E46	—	—	—	—	V
E48	—	—	—	—	V

^a Sclerotia formation in culture.^b LOQ: 5 ng/ml.^c LOQ: 0.2 µg/ml.^d Isolates submitted to molecular identification.**Table 4**
Contamination of spices with Aflatoxin B1.

AFB1 contamination	Spices			
	Paprika (n = 20)	Cumin (n = 20)	Black pepper (n = 20)	White pepper (n = 20)
Number of contaminated samples	19 (95%)	5 (25%)	3 (15%)	2 (10%)
Mean (±SE)	8.1 ± 5.2	1.2 ± 2.2	0.7 ± 1.7	0.34 ± 1.3
Range of contamination (ppb)	1.1–15.4	0.8–6.7	0.7–7.3	2.8–3.7
Number of samples > 10 ppb (%)	8 (40%)	0	0	0

lead to a secondary contamination of the final product with aflatoxins (Aziz & Youssef, 1991; Guergue & Ramirez, 1977).

Based on the toxigenic potential of isolates, Vaamonde et al. (2003) proposed 5 chemotypes for *A. flavus*: chemotype I for AFB and CPA producers; chemotype II for AFB, AFG and CPA producers; chemotype III for AFB only producers; chemotype IV for CPA only producers and chemotype V for non mycotoxin producers. In the present study, toxigenic isolates mainly belong to chemotype III (AFB only producers) and I (AFB and CPA producers). Five percent of toxigenic isolates produced AFG (chemotype II). Interestingly, these isolates also produced sclerotia when cultured on agar medium. The molecular identification of these isolates, based on the complete sequencing of internal transcribed spacers and partial sequencing of β-tubulin, calmodulin and mating-type genes, revealed that they belong to *A. minisclerotigenes* species. This species was considered for a long time as *A. flavus* group II (Geiser, Dorner, Horn, & Taylor, 2000) before being recently raised to the species rank by Pildain et al. (2008). It was first isolated from peanuts or soils of peanut fields in Australia (Geiser, Pitt, & Taylor, 1998) Nigeria (Egel, Cotty, & Elias, 1994), North America (Texas) (Geiser et al., 2000), Argentina (Pildain et al., 2008) and Algeria (Guezlane-Tebibel, Bouras, Mokrane, Benayad, & Mathieu, 2012), and recently from maize and almonds in Portugal (Soares et al., 2012). This species was reported as an aflatoxin G producer by Pildain et al. (2008) and Soares et al. (2012). This is the first report of the presence of this species in spices and such result is consistent with previous surveys demonstrating the contamination of spices with AFG (Cho et al., 2008; Hernandez Hierro, Garcia-Villanova, Rodriguez Torrero, & Toruno Fonseca, 2008).

Our study shows that spices marketed in Morocco are contaminated with AFB1 and that paprika is the most frequently and heavily contaminated spice. Although there is no specific regulation in Morocco regarding mycotoxin content in spices (Zinedine & Manes, 2009), it has to be noted that 40% of samples analyzed in the present study exceeded European regulation for aflatoxin content (European Union, 2006). These results are also in agreement with other surveys done on AFB1 contamination of spices around the world. It has been reported that paprika was more frequently contaminated with aflatoxins compared to pepper and cumin (Martins, Matins, & Bernardo, 2001; O'Riordan & Wilkinson, 2008; Ozbey & Kabak, 2012; Zinedine et al., 2006). The lower aflatoxin contamination of pepper might be related with the presence of alkaloids such as piperine that could inhibit *Aspergillus* development and aflatoxin production (Lee, Mahoney, & Campbell, 2002).

5. Conclusion

This study provides the first description of the fungal contamination of spices marketed in Morocco. Our results reveal the widespread contamination of paprika, cumin and pepper with highly toxigenic strain of *A. flavus* and, for the first time, the presence of *A. minisclerotigenes* in spices. The occurrence of highly toxigenic

strains correlates with AFB1 contamination in the marketed products, especially in paprika. In this later spice, the AFB1 levels often exceed the EU limit. These data highlight the need to take measures to produce better quality spices. For example, the improvement of post-harvested procedures such as drying techniques and storage conditions could be improved to minimize fungal growth and prevent mycotoxin contamination in these commodities. Similarly, packing can also enhance hygienic condition and participate to the supply of healthy spices. The present data suggest that spices represent a source of exposure to the carcinogenic mycotoxin AFB1.

Acknowledgment

This work has been financed by l'Agence Inter-Etablissement pour la Recherche et le Développement (AIRD) (Aflared project), by CAPES-COFECUB (Inhibitox project). A. El Mahgubi was supported by a PhD grant from UNESCO.

References

- Awe, M. J., & Schranz, J. L. (1981). High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxin in spices. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 64, 1377–1382.
- Aziz, N. H., & Youssef, Y. A. (1991). Occurrence of aflatoxins and aflatoxin producing moulds in fresh and processed meat in Egypt. *Food and Additive Contaminants*, 8, 321–331.
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497–516.
- Bondy, G. S., & Pestka, J. J. (2000). Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health B. Critical Reviews*, 3, 109–143.
- Cary, J. W., & Ehrlich, K. C. (2006). Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia*, 162, 167–177.
- Cho, S. H., Lee, C. H., Jang, M. R., Son, Y. W., Lee, S. M., Choi, I. S., et al. (2008). Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Food Chemistry*, 107, 1283–1288.
- Cook, F. K., & Johnson, B. L. (2010). *Microbiological spoilage of cereal products*. In *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_8, pp. 223–244.
- Cotty, P. J., & Jaime-Garcia, R. (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 109–115.
- Dos Santos, V. M., Dorner, J. W., & Carreira, F. (2003). Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. *Mycopathologia*, 156, 133–138.
- Egel, D. S., Cotty, P. J., & Elias, K. S. (1994). Relationships among isolates of *Aspergillus sect. flavi* that vary in aflatoxin production. *Phytopathology*, 84, 906–912.
- Elshafie, A. E., Al Rashdi, T. A., Al Bahry, S. N., & Bakheit, C. S. (2002). Fungi and aflatoxins associated with spices in the sultanate of Oman. *Mycopathologia*, 155, 155–160.
- European Union. (2006). Commission regulation 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L364, 5–24.
- FAO. (2003). *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. FAO food and nutrition papers, Rome, Italy, 81.
- Fazekas, B., Tar, A., & Kovacs, M. (2005). Aflatoxin and ochratoxin A content in spices in Hungary. *Food Additives and Contaminants*, 22, 856–863.
- Freire, F. C. O., Kozakiewicz, Z., & Paterson, R. R. M. (2000). Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and brazil nuts. *Mycopathologia*, 149, 13–19.
- Gauthier, T., Wang, X., Dos Santos, S. J., Fysikopoulos, A., Tadrist, S., Canlet, C., et al. (2012). Trypacidin, a spore-borne toxin from *Aspergillus fumigatus*, is cytotoxic to lung cells. *PLoS One*, 7, e29906.
- Geiser, D. M., Dorner, J. W., Horn, B. W., & Taylor, J. W. (2000). The phylogenetic of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 31, 169–179.
- Geiser, D. M., Pitt, J. I., & Taylor, J. W. (1998). Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.*, 95, 388–393.
- Girardin, H., Latgé, J. P., Srikantha, T., Morrow, B., & Soll, D. R. (1993). Development of DNA probes for fingerprinting *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 1547–1554.
- Guergue, J., & Ramirez, C. (1977). Incidence of aflatoxin potential contamination in Spanish sausages. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, 31, 485–488.
- Guezlane-Tebibel, N., Bouras, N., Mokrane, S., Benayad, T., & Mathieu, F. (2012). Aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from marketed peanuts (*Arachis hypogaea*) in Algiers (Algeria). *Annals of Microbiology*, 62, 1–11.
- Hernandez Hierro, J. M., Garcia-Villanova, R. J., Rodriguez Torrero, P., & Toruno Fonseca, I. M. (2008). Aflatoxins and ochratoxin A in red paprika for retail sale in Spain: occurrence and evaluation of a simultaneous analytical method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 751–756.
- I.A.R.C. (1993). Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, Vol. 56 (pp. 245). Lyon: World Health Organization.
- Khlangwiset, P., Shephard, G. S., & Wu, F. (2011). Aflatoxin and growth impairment: a review. *Critical Reviews of Toxicology*, 41, 740–755.
- Khouchfache, K., Puel, O., Loiseau, N., Delaforge, M., Rivollet, D., Coste, A., et al. (2007). Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells. *BMC Microbiology*, 7, 5.
- Kneifel, W., & Berger, E. (1994). Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. *Journal of Food Protection*, 57, 893–901.
- Landsen, J. A. (1986). Determination of cyclopiazonic acid in peanuts and corn by thin layer chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 69, 964–966.
- Le Bars, J., & Le Bars, P. (1988). Contamination fongique et mycotoxique de plantes pour infusion et de condiments. *Bulletins de la Societe Française de Mycologie Médicale*, 17, 379–384.
- Lee, S. E., Mahoney, N. E., & Campbell, B. C. (2002). Inhibition of aflatoxin B1 biosynthesis by piperlongumine isolated from *Piper longum* L. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 679–682.
- Liu, Y., & Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 118, 818–824.
- Mandee, Q. A. (2005). Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*, 159, 291–298.
- Martins, M. L., Martins, H. M., & Bernardo, F. (2001). Aflatoxins in spices marketed in Portugal. *Food Additives and Contaminants*, 18, 315–319.
- Meissonier, G. M., Pinton, P., Laffite, J., Cossalter, A. M., Gong, Y. Y., Wild, C. P., et al. (2008). Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 23, 142–149.
- O'Riordan, M. J., & Wilkinson, M. G. (2008). A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of imported spice preparations on the Irish retail market. *Food Chemistry*, 107, 1429–1435.
- Ozbey, F., & Kabak, B. (2012). Natural occurrence of aflatoxin and ochratoxin A in spices. *Food Control*, 28, 354–361.
- Peterson, S. W. (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, 100, 205–226.
- Pildain, M. B., Frisvad, J. C., Vaamonde, G., Cabra, D., Varga, J., & Samson, R. A. (2008). Two novel aflatoxin producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 725–735.
- Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., & Andersen, B. (2010). Food and indoor fungi. In P. W. Crous, & R. A. Samson (Eds.), *CBS laboratory manual*, Utrecht, The Netherlands.
- Sanchis, V., & Magan, N. (2004). Environmental conditions affecting mycotoxins. In N. Magan, & M. Olsen (Eds.), *Mycotoxins in food: Detection and control* (pp. 174). Oxford: Woodhead Publishing Ltd.
- Shotwell, O. L., Burg, W. R., & Diller, T. (1981). Thin layer chromatographic determination of aflatoxin in corn dust. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 64, 1060–1063.
- Soares, C., Rodrigues, P., Peterson, S. W., & Venancio, N. L. A. (2012). Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. *Mycologia*, 104, 692–697.
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernandez Pinto, V., Comerio, R., & Degrossi, C. (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 79–84.
- Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Two new aflatoxin producing species and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, 69, 57–80.
- Von Arx, J. A. (1981). In J. Cramer (Ed.), *The genera of fungi sporulating in pure culture* (3rd ed.). Dehradun, India.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). San Diego, CA: Academic Press.
- Yao, Z., & Liao, W. (2006). Fungal respiratory disease. *Current Opinion Pulmonary Medicine*, 12, 222–227.
- Zinedine, A., Brera, C., Elakhadri, S., Catano, C., Debagnach, F., Angelini, S., et al. (2006). Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control*, 17, 868–874.
- Zinedine, A., & Manes, J. (2009). Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control*, 20, 334–344.

3. Conclusion

Cette étude décrit la contamination fongique des épices commercialisées au Maroc. Nos résultats montrent une contamination très fréquente du paprika, du cumin et du poivre par des souches fortement toxigènes d'*Aspergillus flavus*. Notre étude a aussi permis de montrer, pour la première fois, la présence dans les épices d'*Aspergillus minisclerotigenes* (figure 15). Cette espèce se distingue d'*A. flavus* par la production de sclérotes de petites tailles (<400 µm) et un potentiel toxigène différent, associant la synthèse d'aflatoxines B et G. Cette espèce a longtemps été considérée comme un variant d'*A. flavus* (*Aspergillus flavus* groupe II) avant d'être élevée au rang d'espèce en 2008 (Pildain *et al.*, 2008).

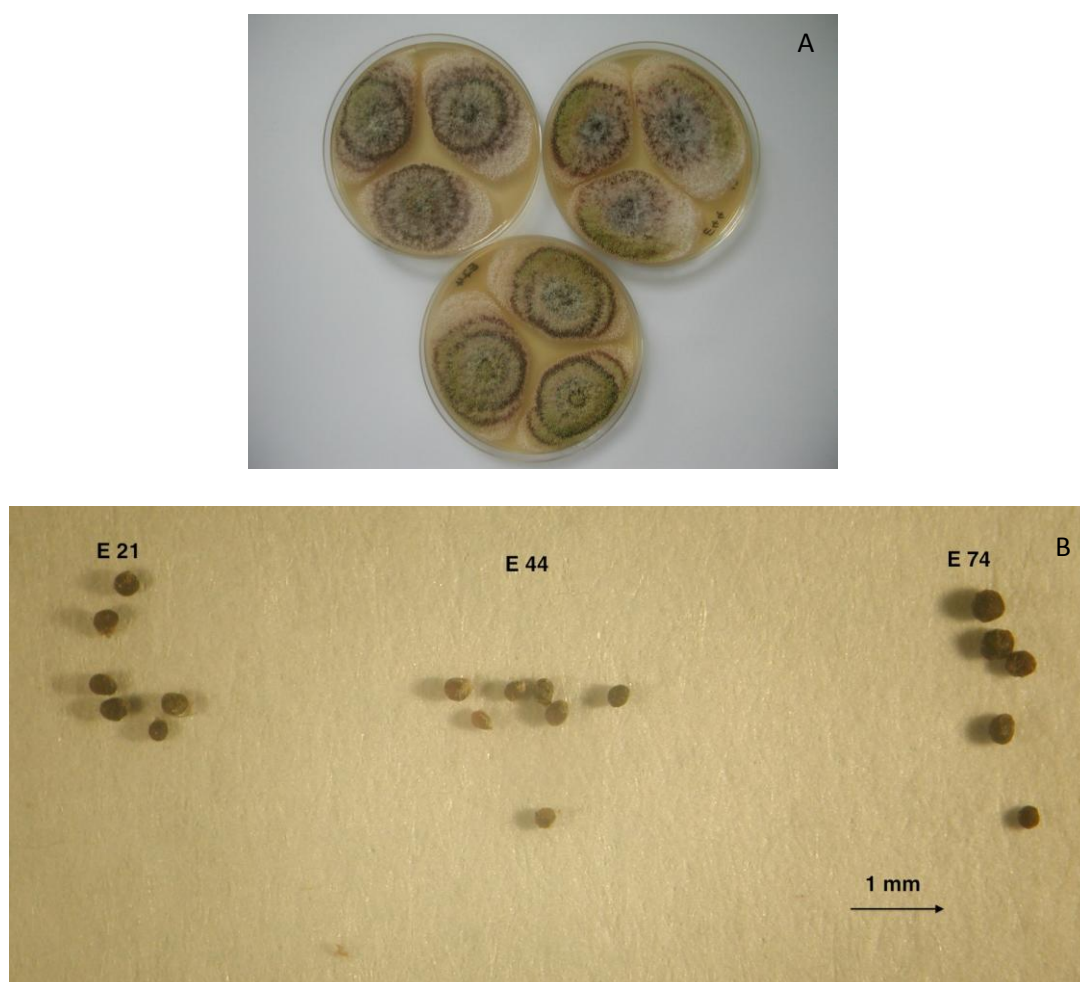


Figure 15 : *Aspergillus minisclerotigenes*

A : Aspect des colonies des 3 isolats d'*A. minisclerotigenes* après 5 jours de culture sur MEA à 27°C

B : Aspect des sclérotes

La présence de souches fortement toxigènes est reliée, notamment pour le paprika, à la contamination de l'épice par l'AFB1. Ainsi, pour cette épice, les niveaux de contamination observés sont souvent largement supérieurs aux normes européennes en vigueur. Ces résultats soulignent l'importance d'améliorer les procédures post-récoltes de préparation des épices et en particulier le séchage. De même, le conditionnement de ces matières premières pourrait contribuer à réduire leur niveau de contamination fongique et mycotoxique.

Notre étude confirme aussi que le poivre est rarement contaminé par l'AFB1 alors que la présence de souches fortement toxigènes est, quant à elle, très fréquente. Ce constat peut laisser supposer que la composition du poivre ne permet pas la synthèse de l'AFB1. C'est cette hypothèse qui a été testée dans la seconde partie de mon travail expérimental.

Troisième partie

Effet d'extraits aqueux de poivre noir sur la synthèse des aflatoxines

1. Introduction

Dans l'étude précédente, nous avons montré que les épices étaient souvent contaminées par des souches toxigènes d'*Aspergillus* de la section *Flavi*. Cependant, nous avons aussi observé que, dans certaines d'entre elles et notamment dans le poivre, la contamination par les moisissures, ne s'accompagnait que rarement d'une contamination mycotoxique. Ce constat est en accord avec la plupart des données bibliographiques disponibles concernant la contamination de cette épice par les aflatoxines et qui montrent une fréquence et des niveaux de contamination toujours très faibles.

Des travaux antérieurs avaient démontré que, dans le poivre noir, certains alcaloïdes tels que la piperine, constituant majeur du poivre lui conférant son goût piquant, et la piperlongumine étaient capable de moduler négativement la croissance fongique (voir paragraphe 2.6.4.4.). Les principales caractéristiques de l'effet observé étaient une inhibition partielle de la synthèse d'AFB1 associée à une modulation négative relativement importante de la croissance fongique. De plus, les alcaloïdes du poivre sont des composés liposolubles, très peu solubles dans l'eau et généralement extraits du poivre par des solvants tels que l'hexane ou l'acétate d'éthyle.

Lors d'essais préliminaires, nous avons utilisé un milieu liquide YES additionné ou non de poivre noir en poudre et regardé l'influence de ces milieux sur la production d'AFB1 par une souche d'*A. flavus* toxigène. Ces essais ont montré que l'ajout de poivre dans un milieu aqueux entraînait une inhibition de la synthèse d'AFB1 sans toutefois moduler la croissance fongique mesurée par le poids sec du mycélium.

Ces premiers tests nous ont amené à émettre l'hypothèse que le poivre noir pouvait contenir des composés hydrosolubles, distincts des alcaloïdes précédemment identifiés et capables de moduler spécifiquement la toxinogénèse, sans modifier la croissance fongique.

Nous nous sommes donc attachés à caractériser l'effet d'extraits aqueux de poivre noir sur la synthèse des aflatoxines.

2. Matériel et méthodes

2.1. Solvants et réactifs

L'ensemble des solvants (qualité HPLC) et des réactifs utilisés provient de Prolabo (Paris, France). Les mycotoxines pures utilisées comme standard pour la quantification proviennent de Sigma (Saint Louis, MO, USA).

2.2. Extrait aqueux de poivre noir

L'extrait aqueux de poivre noir utilisé pour nos essais a été préparé à partir de poivre noir moulu acheté dans le commerce (flacons en verre de 50g).

20g de poivre ont été mis en suspension dans 80ml d'H₂O stérile et placés sur table d'agitation à 226 tr/min pendant 17h. L'extrait a ensuite été filtré et centrifugé à 2500tr/min pendant 20min. Le surnageant récupéré a été centrifugé à 10000tr/min pendant 15min puis stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 15min.

2.3. Solution de pipérine

La pipérine commercialisée par Sigma France, a été mis en solution dans du DMSO (1 mg/ml) puis diluée pour obtenir des quantités finales de 1, 4, 16,64 et 250µg de piperine par boîte de Pétri. La quantité finale de DMSO n'a pas dépassé 20 µl, dose sans effet sur la croissance et la toxinogénèse fongique.

2.4. Souches fongiques

Les souches d'*Aspergillus flavus* utilisées dans ces essais ont été isolées d'échantillons d'épices en provenance du Maroc (voir deuxième partie).

Ces souches sont conservées au laboratoire sur milieu MEA à 4°C.

Le potentiel toxigène de ces souches a été déterminé après 15 jours de culture sur milieu liquide YES (Yeast Extract-Sucrose), broyage et quantification des mycotoxines comme décrit ci-après.

Tableau 19 : Caractérisation des souches d'*Aspergillus* de la section *Flavi* après 8 jours de culture sur milieu MEA

Souche	Caractéristiques macroscopique				Caractéristiques microscopiques			Mycotoxines				
	C	S	Sclérotés	Exs	C	Phi	conidies	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	ACP
N	v-jaune	++	+	+++ G	R	Bi (uni)	SR	++	-	++	-	-
E28	v-jaune pâle	+++	-	++ G	R	Bi	gl L	+++	-	-	-	+++
E51	v- blanche	+++	-	G	R	Bi	O r	+++	+	-	-	+++
E56	v	+++	-	++ G	R	Bi	O r	+	-	-	-	+++
E71	v-jaune pâle	+++	-	+	R	Uni (Bi)	S r	+++	+	-	-	+
E73 (NRRL 62477)	v	++++	-	-	r	Bi	O r	+	-	-	-	+
E78	v	+++	-	++ g	R	Bi	gl r	++	+	-	-	+
A. <i>minisclerotigenes</i> E21	v-n- jaune	+	+++	+++ G	r	Bi (uni)	gl L	+	-	+	+	+++
A. <i>minisclerotigenes</i> E44	v-n- jaune	+	+++	+++ G	r	Uni (bi)	gl r	++	-	+++	-	+++

C = couleur : (v) vert - (n) noir

S = sporulation (+) Faible, (++) Moyenne, (+++) Forte, (++++) Très forte

Production de sclérotés (-) négatif, (+) Faible, (++) Moyenne, (+++) Forte

Exs = Exsudat : (G) grosses gouttes - (g) Petites gouttes

C = conidiophore (R) Très rugueux - (r) Finement rugueux - (L) Lisse

Phi = phialides (UNI) Unisériées - (BI) bisériées

Conidies (gl) globose - (S) Subglobose - (O) oblongues

Mycotoxines : (-) Non détectable ; (+) < 10 µg/boîte ; (++) ≥ 10 < 100 µg/boîte ; (+++) ≥ 100 µg/boîte

ACP : Acide cyclopiazonique

Les autres souches d'*Aspergillus* de la section *Flavi* potentiellement productrices d'aflatoxines ont été obtenues auprès de l'Agriculture Research Service (NRRL) (Northern Regional Research Laboratory)(Tableau 20).

Les souches d'*Aspergillus versicolor* et d'*Aspergillus nidulans* potentiellement productrices de stérigmatocystine proviennent de la collection du laboratoire.

Tableau 20 : Espèces d'*Aspergillus* de la section *Flavi* utilisées dans l'étude

Espèce	Référence NRRL
<i>Aspergillus parasiticus</i>	502
<i>Aspergillus parasiticus</i>	4123
<i>Aspergillus parasiticus</i>	6433
<i>Aspergillus nomius</i>	13137
<i>Aspergillus tamarii</i>	20818
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	25517
<i>Aspergillus caelatus</i>	25528
<i>Aspergillus bombycis</i>	26010
<i>Aspergillus parasiticus</i> (mutant NOR)	6111

2.5. Culture fongique

Pour les essais, les souches ont préalablement été mises en culture sur boîte de Petri contenant du milieu MEA. Après 1 semaine, ces boîtes ont été lavées avec du Tween 80 (0,05%) (18ml) afin de récupérer les spores. Ces dernières ont été dénombrées par comptage direct à la cellule de Malassez et après mise en culture sur MEA (numération après 3 jours de culture). La solution mère contenant les spores fongiques a été diluée afin de pouvoir inoculer les boîtes de Petri de l'essai avec 100 spores dans un volume de 5 à 8 µl.

Cet inoculum a été déposé en position centrale sur des boîtes de Pétri contenant du milieu malt additionné ou non d'une proportion croissante d'extrait de poivre (0,0156, 0,0312, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1 et 2%) ou de solution de pipérine (1, 4, 16,64 et 250µg par culture). Elles ont été ensuite placées à 27°C et à l'obscurité pendant 4 et 8 jours.

2.6. Préparation des broyats

Pour réaliser les différentes analyses physico-chimiques, les cultures (Gélose+mycélium) ont été broyées après 4 et 8 jours d'incubation. Pour cela, le

matériel de culture a été placé dans un flacon conique contenant 50ml de tampon phosphate 50mM froid (PH 7,4), homogénéisé au Turax puis broyé finement par passage au Potter.

2.7. Mesures de la croissance fongique

2.7.1. Croissance, morphologie et sporulation

Chaque jour, les colonies se développant sur les milieux additionnés ou non de poivre et pipérine ont fait l'objet d'un examen morphologique macroscopique afin d'apprécier l'effet des extraits de poivre et de la pipérine sur l'aspect du thalle. Les colonies ont été mesurées quotidiennement pour apprécier la vitesse de croissance. Après 8 jours d'incubation, l'examen macroscopique a été complété par un examen microscopique.

La sporulation a été évaluée après lavage des boîtes avec 20 ml de tween 80 (0,5%) et passage au Stomacher pour homogénéisation. Les spores récoltées ont ensuite été comptées à la cellule de Malassez.

2.7.2. Dosage de l'ergostérol

L'ergostérol est un constituant de la paroi fongique, considéré comme un bon marqueur de la croissance mycélienne (Pietri *et al.*, 2004).

L'ergostérol a été mesuré en utilisant la méthode développée au laboratoire (Bailly *et al.*, 1999). Pour cela, 15ml de broyat ont été saponifiés pendant 30 min à 80°C en présence de 45ml méthanol, 15ml éthanol, 60µl pyrogallol (10% éthanol) et 6g de KOH.

Après filtration sur papier plissé, une double extraction a été faite à l'éther de pétrole (30ml). Après deux lavages des extraits à l'eau acide (pH 2,5), une partie (5ml) de l'extrait a été évaporée à sec et reprise dans l'éthanol (100 µl).

La quantification de l'ergostérol est ensuite réalisée par fluorodensitométrie après séparation par chromatographie planaire (CCM). Pour cela, 3µl d'extrait ont été déposés sur des plaques de silice (Merck n°5553, VWR, Fontenay sous-bois, France). Le développement a été effectué dans un mélange toluène-acétonitrile (70:30/v:v). Après séchage, les plaques ont été chauffées à 130°C pendant 30 minutes. La

quantification de la molécule a été réalisée par mesure de la fluorescence à 365 nm en utilisant un fluorodensitomètre (Shimadzu CS930). La quantification a été réalisée par comparaison avec une gamme étalon déposée sur la même plaque.

2.7.3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant les kits Biorad comme décrit par le fabricant (Biorad, Paris, France). Cette méthode est basée sur le changement de couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. La concentration en protéines de l'échantillon est déterminée, après lecture de la densité optique à 595 nm, par comparaison avec un courbe étalon réalisé dans les mêmes conditions à partir de concentrations connues d'albumine sérique bovine (BSA).

2.8. Analyses physico-chimiques

2.8.1. Dosage des mycotoxines

Les différentes toxines étudiées ont été mesurées après extraction du matériel de culture et séparation des extraits par chromatographie planaire sur des plaques de silice (Merck n°5553, VWR, Fontenay sous-bois, France). Les teneurs en mycotoxines ont ensuite été mesurées par fluorodensitométrie à l'aide d'un fluorodensitomètre Shimadzu CS930 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japon). La quantification a été réalisée par comparaison avec une gamme étalon déposée sur la même plaque.

2.8.1.1. Dosage des aflatoxines B1, B2, G1, G2

Pour le dosage des aflatoxines, 8 ml de broyat ont été extraits avec 8 ml de chloroforme. Après centrifugation à 3500tr/min pendant 5min, l'extrait a été filtré sur filtre séparateur de phase (Whatman PS). La phase chloroformique récupérée a été évaporée à sec puis reprise dans 100µl d'un mélange toluène-acétonitrile (98:2).

Après dépôt sur la plaque de silice de 3µl, les extraits sont séparés par migration dans un bain de éther diéthylique/méthanol /eau (96:3:1/v:v:v). Après séchage, la détermination de la teneur en aflatoxine est réalisée par mesure de la fluorescence

après excitation à une longueur d'onde λ de 365 nm. La limite de quantification de cette méthode est de 5 ng/g (Park *et al.*, 1994).

2.8.1.2. Dosage de la stérigmatocystine

La stérigmatocystine a été extraite selon la même procédure que celle utilisée pour les aflatoxines. Après évaporation à sec, l'extrait a ensuite été repris dans 100 μ l de toluène-acétonitrile (98:2/v:v). Le dosage de la toxine a été réalisé selon la méthode d'Athnasios (Athnasios et Kuhn, 1977). Après dépôt sur silice de 3 μ l, les extraits sont séparés par migration dans un bain de toluène/acide acétique (90:10/v:v). Après séchage, la plaque est révélée par vaporisation de chlorure d'aluminium 20% et chauffage 10min à 120°C. La stérigmatocystine est ensuite quantifiée par mesure de la fluorescence (verte) émise après excitation à une longueur d'onde λ de 360 nm. La limite de quantification de cette méthode est de 2 μ g/g.

2.8.1.3. Dosage de l'acide cyclopiazonique (ACP)

Pour le dosage de l'acide cyclopiazonique, 8 ml du broyat ont été extraits avec 8 ml d'un mélange chloroforme/méthanol (50:50/v:v). Après centrifugation à 3500tr/min pendant 5min, l'extrait est filtré sur séparateur de phase. La phase chloroformique a été évaporée à sec et l'extrait repris dans 100 μ l du méthanol.

Le dosage de l'acide cyclopiazonique a été réalisé selon la méthode de Landsen (Landsen, 1986). Après dépôt sur plaque de silice de 3 μ l, les extraits ont été séparés par migration dans un bain d'acétate d'éthyle /isopropanol /ammoniac (20:15:10/v:v:v). Après séchage, les plaques sont révélées par vaporisation d'une solution de PDMAB (Paradiméthylaminobenzaldehyde) (1/4 PDMAB à 10% dans HCl pur + 3/4 acétone) jusqu'à apparition de spots violets. L'acide cyclopiazonique est ensuite quantifié à une longueur d'onde λ de 600 nm. La limite de quantification de cette méthode est de 200 ng/g.

2.8.1.4. Dosage de l'acide norsoloronique (NOR)

Pour le dosage de l'acide norsoloronique, 8 ml du broyat ont été extraits avec 3ml d'acétone. Après agitation à 300t/minute pendant 45min, 5ml de chloroforme sont ajoutés et le mélange est agité pendant 1 heure supplémentaire. Ensuite, l'extrait est filtré sur séparateur de phase. Le volume récupéré a été évaporé à sec et l'extrait sec

repris dans 100µl d'éthanol. Le dosage de l'acide norsoloronique, a été réalisé selon la méthode de Trail (Trail *et al.*, 1994). Après dépôt sur plaque de silice, les extraits (3 µl) ont été séparés par migration dans un bain de chloroforme/acétone (95:5/v:v). Après séchage, la détermination de la teneur en NOR est réalisée par fluorodensitométrie à 600 nm et quantification des spots oranges caractéristiques de la molécule.

2.8.2. Marqueurs de stress oxydatif

2.8.2.1 Préparation des extraits

20 ml de broyat ont été centrifugés à 12000g et 4°C pendant 30 min. Le surnageant qui contient la fraction soluble des protéines est conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

2.8.2.1.1. Dosage du glutathion (GSH)

Le dosage du GSH a été effectué selon la méthode d'Ellman (Ellman, 1959), modifiée par Rumora (Rumora *et al.*, 2007). Cette méthode est basée sur la réaction entre le glutathion réduit (GSH) et le DTNB (acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque ou réactif d'Ellman) qui libère l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB) dont la coloration est jaune.

En bref, 100µl de l'échantillon ont été ajoutés à un mélange de 850µl du tampon phosphate 0,3M (pH 7,4) et 50µl de DTNB 10mM. La lecture a été réalisée par spectrophotométrie à 412 nm. La quantité du GSH est ensuite calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire $14.15 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Eyer *et al.*, 2003). Les teneurs sont ensuite normalisées par rapport à la teneur en protéine de l'échantillon.

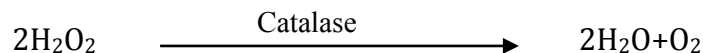
2.8.2.1.2 Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

Le dosage de la SOD a été réalisé en utilisant la méthode de Sun (Sun *et al.*, 1988). Cette méthode repose sur la réduction du sel de tetrazolium (NBT) en bleu de formazan sous l'action des radicaux super-oxydes. Cette transformation entraîne un changement de couleur quantifiable par mesure de la densité optique à 560 nm. Une unité enzymatique de SOD correspond à la quantité d'extrait susceptible d'induire une inhibition de 50% de la réaction de réduction du nitrobleu de tétrazolum.

L'activité SOD de l'échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée dans les mêmes conditions et contenant des quantités connues de SOD.

2.8.2.1.3. Dosage de l'activité de la catalase

L'activité de la catalase a été déterminée par la méthode décrite par Goht (Góth, 1991). Cette méthode est basée sur la mesure de la disparition du peroxyde d'hydrogène sous l'action de la catalase selon la réaction suivante :



Pour cela, 1 ml de H_2O_2 à 30% (65mM) a été ajouté à 0.2ml d'échantillon. Après 1 minute d'incubation, la réaction est arrêtée en ajoutant 1ml de molybdate d'ammonium 32,4mM. 2 blancs ont été utilisés afin de déterminer l'activité.

Témoin d'échantillon (T)	Blanc 2	Blanc 3	Volume en ml
H_2O_2 (65mM)	H_2O_2 (65mM)	Tampon phosphate (0,06M, pH 7,4)	1
molybdate d'ammonium (32,4mM)			1
Echantillon	Tampon phosphate (0,06M, pH 7,4)	Tampon phosphate (0,06M, pH 7,4)	0.2

L'absorbance est mesurée à 405 nm.

Les résultats ont été calculés en appliquant l'équation suivante (Góth, 1991) :

$$\text{Activité en catalase (KU/l)} = \frac{\text{Abs E} - \text{Abs T}}{\text{Abs Blanc 2} - \text{Abs Blanc 3}} * 271$$

Abs E : absorbance de l'échantillon

Abs T : absorbance du témoin

2.9. Fractionnement par chromatographie flash des extraits de poivre

Dix ml de l'extrait aqueux de poivre noir, obtenu comme décrit dans le paragraphe 2, ont été fractionnés par chromatographie flash automatisée (Teledyne Isco, Lincoln, NE). Le fractionnement a été réalisé sur une colonne en phase inverse Flash Chromabond® RS25 C18 (Macherey-Nagel) (longueur 16,5 cm, diamètre interne 21,2 mm, taille de particules 45 μm , taille des pores 60 Å, poids d'adsorbant 26 g) avec un débit de 25 ml/min et en utilisant un gradient de solvants. Le système de solvants utilisé était constitué d'acide formique (10 %) (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B).

La proportion initiale du solvant B variait de 10 à 90% sur 14 volumes de colonne (14 CV, soit 672 ml), pour revenir à la proportion initiale pendant 3 CV (soit 144 ml). Les

longueurs d'onde utilisées étaient 254 nm pour la détection et 341 nm pour la visualisation des pics.

La chromatographie a permis de séparer les extraits aqueux en 10 fractions. La figure 16 montre un chromatogramme type et les fractions correspondantes.

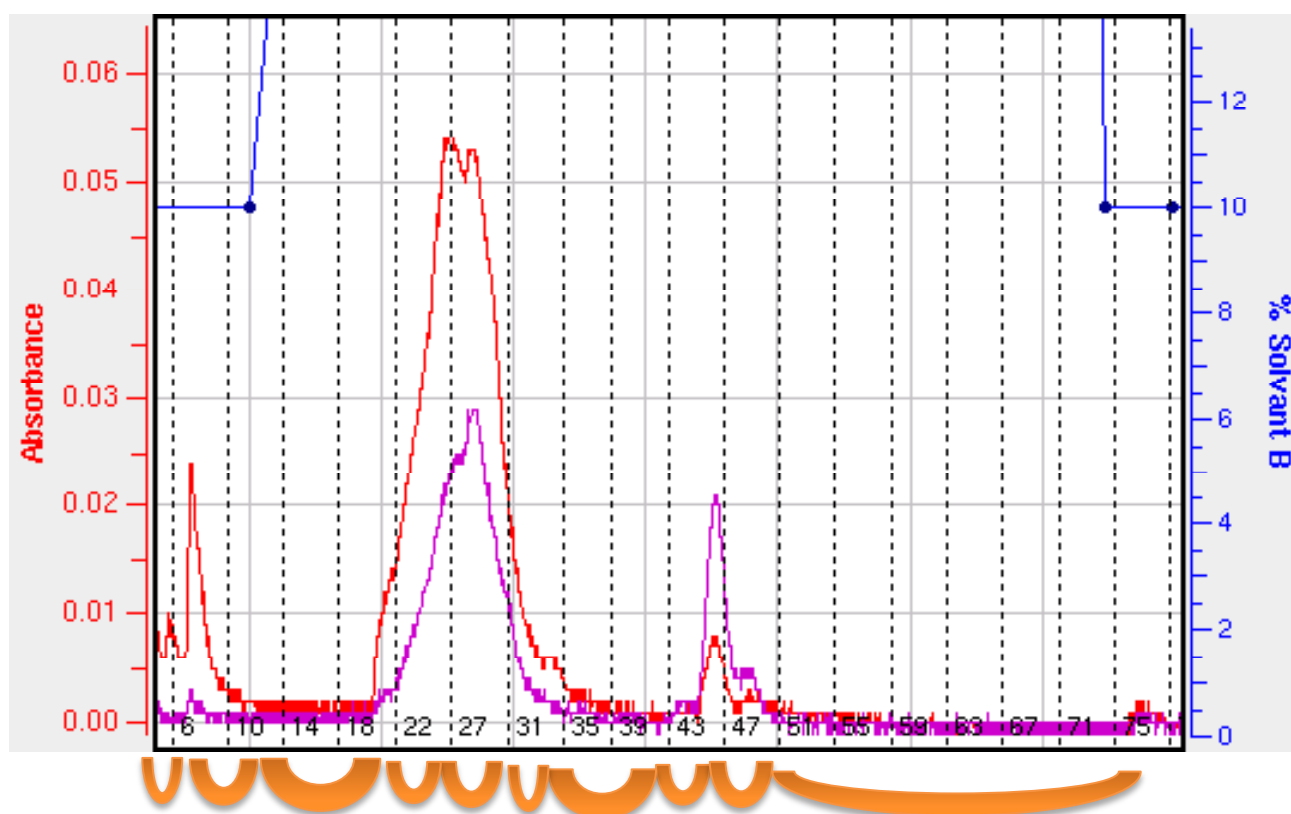


Figure 16 : Chromatographie flash des extraits aqueux de poivre. Obtention de 10 fractions

2.10. Analyse statistique

L'ensemble des expérimentations a été réalisé en triplicate. Les résultats exprimés correspondent aux moyennes obtenues +/- les écarts types. Afin d'évaluer la significativité des différences observées, nous avons utilisé un T-test (logiciel *Prism*). Les différences significatives sont indiquées par des lettres ($p < 0,05$).

3. Résultats

3.1. Effet d'extraits aqueux de poivre noir sur la production des aflatoxines

3.1.1. Impact des extraits sur la production d'aflatoxine B1

La souche E73 d'*Aspergillus flavus* utilisée dans ces essais a été isolée d'un échantillon d'épice. Cette souche a été référencée auprès de la NRRL et porte désormais le numéro de référence : NRRL 62477.

L'ajout d'extrait aqueux du poivre noir entraîne une inhibition dose-dépendante de la production d'AFB1 par la souche d'*Aspergillus flavus* NRRL 62477 (figure 17). Cette inhibition est observée de manière significative pour des concentrations supérieures à 0,0312 %. En présence de 0,5% d'extrait, l'inhibition atteint presque 96%. Et en présence de concentrations supérieures à 0,5% d'extrait, l'inhibition de la synthèse est quasi-totale, la production d'AFB1 étant alors inférieure à la limite de détection.

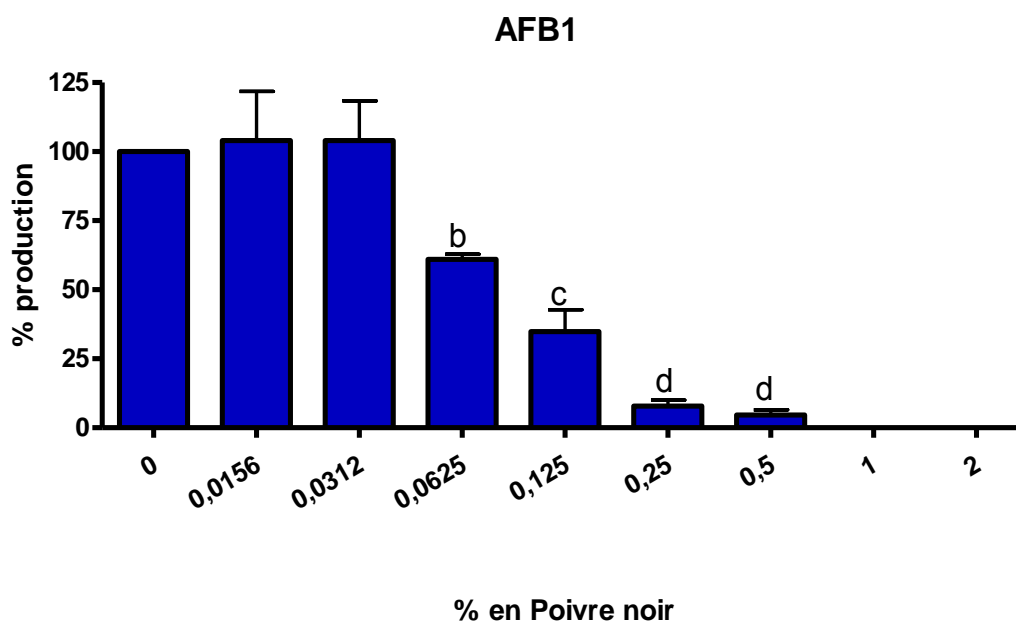


Figure 17 : Production d'AFB1 par *Aspergillus flavus*, NRRL 62477 en fonction de la concentration en extrait de poivre après 8 jours d'incubation (% par rapport au témoin non traité).

3.1.2. Impact des extraits sur la croissance fongique

La figure 18 montre l'évolution des diamètres des colonies d'*Aspergillus flavus* NRRL 62477 cultivées en présence de concentrations croissantes d'extraits aqueux de poivre noir. Globalement, les courbes de croissance mycélienne ont le même aspect avec une croissance linéaire pendant toute la durée d'incubation. L'ajout de concentrations croissantes de poivre entraîne un ralentissement mineur de la vitesse de croissance mycélienne qui passe de $58,3 \pm 0,58$ mm après 8 jours de culture pour les témoins à $56,7 \pm 0,14$; $55,7 \pm 0,58$ et $53,7 \pm 0,58$ mm pour des concentrations de 0,125, 0,250 et 0,5% de poivre respectivement.

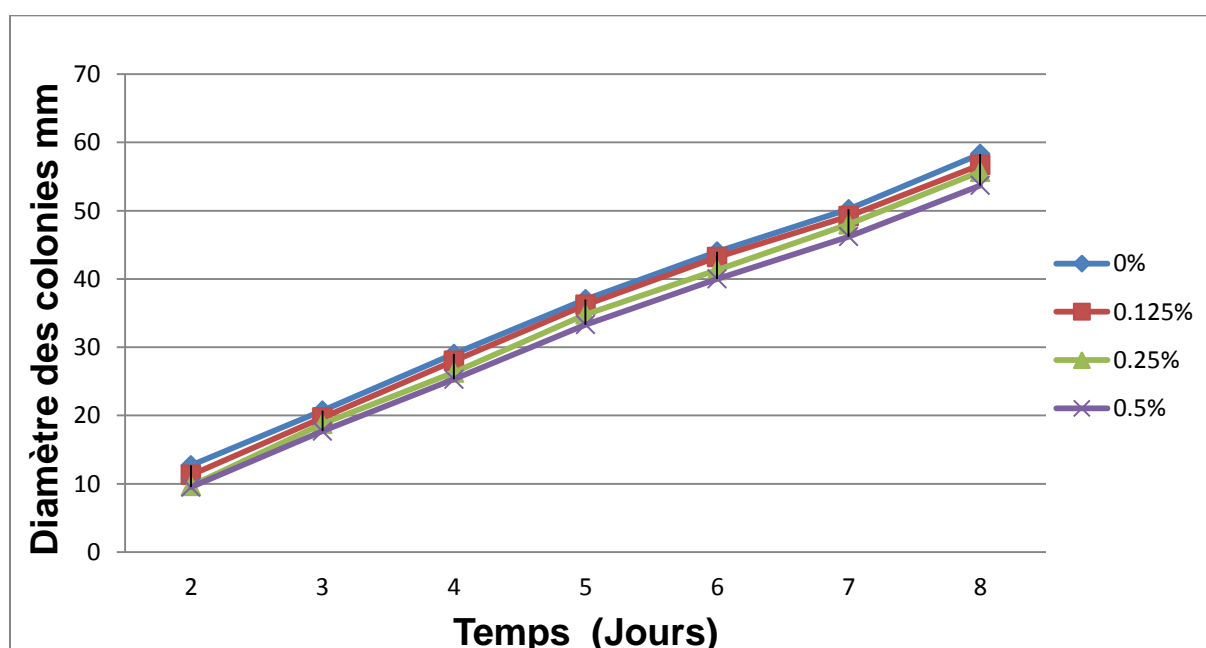


Figure 18 : Croissance mycélienne de la souche *Aspergillus flavus* NRRL 62477 cultivée en présence de concentrations croissantes d'extrait de poivre

Le tableau 21 montre l'impact des extraits aqueux de poivre sur différents paramètres associés à la croissance fongique (nombre de spores, teneur en ergostérol et en protéines).

Il ressort de ces données que l'inhibition de la toxinogénèse n'est pas associée à une modulation du développement fongique. En effet, les extraits de poivre n'ont pas

d'impact sur la sporulation et ne modifient pas la synthèse d'ergostérol ou des protéines, y compris à des concentrations de 0,5 % dans le milieu de culture.

Tableau 21 : Teneur en ergostérol, protéines et nombre des spores après culture d'*Aspergillus flavus* NRRL 62477 pendant 8 jours en présence de concentrations croissantes d'extrait de poivre.

% d'extrait de Poivre Noir	0	0,125	0,250	0,5
Nombre de spores ($\times 10^9$)	4,05 \pm 0,55	3,89 \pm 0,33	4,81 \pm 0,25	5,1 \pm 0,073
Ergostérol ($\mu\text{g}/\text{boite}$)	265,81 \pm 19,53	264,1 \pm 12,68	274,23 \pm 52,43	267,81 \pm 21,71
Protéines (mg/boite)	15,15 \pm 0,31	15,40 \pm 0,48	15,17 \pm 0,21	15,26 \pm 0,39

3.1.3. Aspect morphologique

La figure 19 représente l'aspect de colonies d'*Aspergillus flavus* NRRL 62477 après 4 jours de culture en présence ou absence d'extrait de poivre. Les différences sont minimales : les colonies apparaissent légèrement plus compactes avec un mycélium aérien plus fasciculé que sur MEA seul. Aucune différence morphologique n'a été observée lors de l'examen microscopique des échantillons après 8 jours de culture.

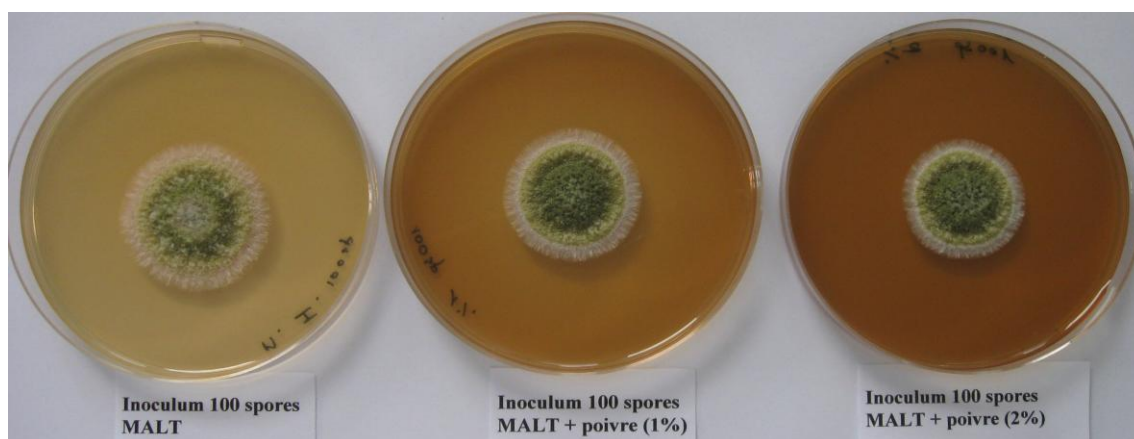


Figure 19 : Effet des extraits aqueux de poivre sur l'aspect des colonies d'*A. flavus* NRRL 62477 après 4j de culture à 27°C.

3.2. Effet sur d'autres souches d'*Aspergillus flavus*

Les résultats obtenus après exposition de différentes souches d'*A. flavus* sur la croissance et la production d'AFB1 sont récapitulés dans le tableau 22.

Ces données montrent que toutes les souches d'*Aspergillus flavus* issues de nos travaux sur les épices ont une croissance relativement similaire, le diamètre des colonies après 8 jours étant en moyenne de 64,9 +/- 2,8 mm.

L'ajout de 0,5% d'extrait de poivre ne modifie pas de façon significative la croissance des souches testées. En effet, la croissance n'est que très légèrement ralentie (7,8 +/- 1,4 % en moyenne).

L'analyse de la production d'aflatoxine B1 après culture des différentes souches en présence de 0,5% de poivre montre que les extraits aqueux de poivre noir entraînent une inhibition de la production d'AFB1 dans toutes les souches.

L'inhibition de la synthèse est, en moyenne, de 85,5% pour les souches d'*Aspergillus flavus*. Cette inhibition ne dépend pas du niveau initial de production de la mycotoxine.

Tableau 22 : Impact d'extraits aqueux de poivre noir à 0,5% sur la croissance et la synthèse d'AFB1 par différentes souches d'*Aspergillus flavus*

souche	Diamètre des colonies			AFB1 (µg/boîte)		
	0%	0.5%	I (%)	0%	0.5%	I (%)
N	68.1±0.0	62.0±0.6	8.4±1.4	12.7 ± 1.9	0.76±0.4	94.03
E28	65.3±0.3	61.0±1.4	6.9±2.1	116.3 ±19.6	11.7 ±0.4	89.88
E51	65.3±0.3	59.8±0.7	8.4±0.8	605.7 ±212.5	171.9 ±144	71.6
E56	59.3±0.6	53.2±0.6	10.3±1.2	4.2 ±1.7	0.1 ±0.05	97.5
E71	67.7±0.6	63.6±0.5	6±0.2	357.2 ±64.7	75.4 ±7.6	78.9
E73	64.5±0.7	60.2±0.3	6.7±0.7	6.5 ±0.03	0.08 ±0.03	98.8
E78	64 ±1	59.0±0.9	7.8±2	88.6 ±31.2	28.4 ±7.7	67.9

(I(%)) : % d'inhibition par rapport au contrôle)

3.3. Effet sur d'autres espèces de la section *Flavi*

Un certain nombre de souches toxigènes appartenant à d'autres espèces de la section *Flavi* ont été cultivées en présence de 0 et 0,5% d'extrait de poivre noir. L'impact sur leur croissance a été évalué par mesure quotidienne du diamètre des colonies fongiques. L'ensemble des résultats est récapitulé dans le tableau 23. Il en ressort que toutes les espèces de la section ont une croissance relativement similaire, le diamètre des colonies après 8 jours étant en moyenne de 69,7 +/- 6,2 mm.

L'ajout de 0,5% d'extrait de poivre ne modifie pas de façon significative la croissance des souches testées. En effet, la croissance n'est que très légèrement ralentie (4,7 +/- 1,5 % en moyenne). Seule la souche NRRL 25517 d'*Aspergillus pseudotamarii* présente une inhibition plus importante avec un ralentissement de la croissance de presque 20%.

L'analyse de la production d'aflatoxine B1 après culture des différentes souches en présence de 0,5% de poivre montre que les extraits aqueux de poivre noir entraînent une inhibition de la production d'AFB1 dans toutes les espèces à l'exception de la souche NRRL 13137 d'*Aspergillus nomius*.

L'inhibition de la synthèse est en moyenne de 55% pour toutes les espèces de la section *Flavi* testées. Cette inhibition ne dépend pas du niveau initial de production de la mycotoxine.

Tableau 23 : Impact d'extraits aqueux de poivre sur la croissance et la synthèse d'AFB1 sur plusieurs espèces d'*Aspergillus* de la section *Flavi*

Souche	Diamètre des colonies			AFB1 (µg/boîte)		
	0%	0.5%	I (%)	0%	0.5%	I (%)
<i>A.parasiticus</i> (NRRL4123)	72.33±0.3	69.83±0.7	3.4±1.2	477.1 ±56.9	366.4±70.7	23.2
<i>A.parasiticus</i> (NRRL6433)	74.17±0.3	72.33±0.6	2.5±1.02	479.74±109.3	290.9±51	39.3
<i>A. nomius</i> (NRRL13137)	78.5±0.5	73.8±0.7	5.9±1.4	55,3±33,7	67,5±39,6	
<i>A.pseudotamarii</i> (NRRL25517)	70.83±0.3	57.67±0.3	18.6±0.4	190.5±77.3	25.41±10.3	86.66
<i>A. bombycis</i> (NRRL26010)	68.67±1.3	64.67±1.3	5.8±3.5	9.43±3.10	2.90±0.65	69.27

<i>A. minisclerotigenes</i> E21	61.3±1.9	57.7±0.6	5.9±3.8	1.76 ±0.8	0.45 ±0.1	74.29
<i>A. minisclerotigenes</i> E44	62.2±0.7	59.5±0.7	4.8±2.2	22.4 ±1.7	19.4 ±3.1	13.5

(I(%)) : % d'inhibition par rapport au contrôle)

La souche E44 d'*Aspergillus minisclerotigenes* présente une inhibition beaucoup moins importante que celle observée dans les autres souches de la section *Flavi*. Afin de vérifier si cette souche était résistante à l'effet des extraits de poivre, nous avons caractérisé l'impact de concentrations supérieures. La figure 20 montre qu'un effet similaire à celui observé dans les autres souches peut être observé en augmentant les concentrations d'extrait de poivre dans le milieu. Ainsi, après culture en présence de 2% d'extrait de poivre, l'inhibition passe à 60%.

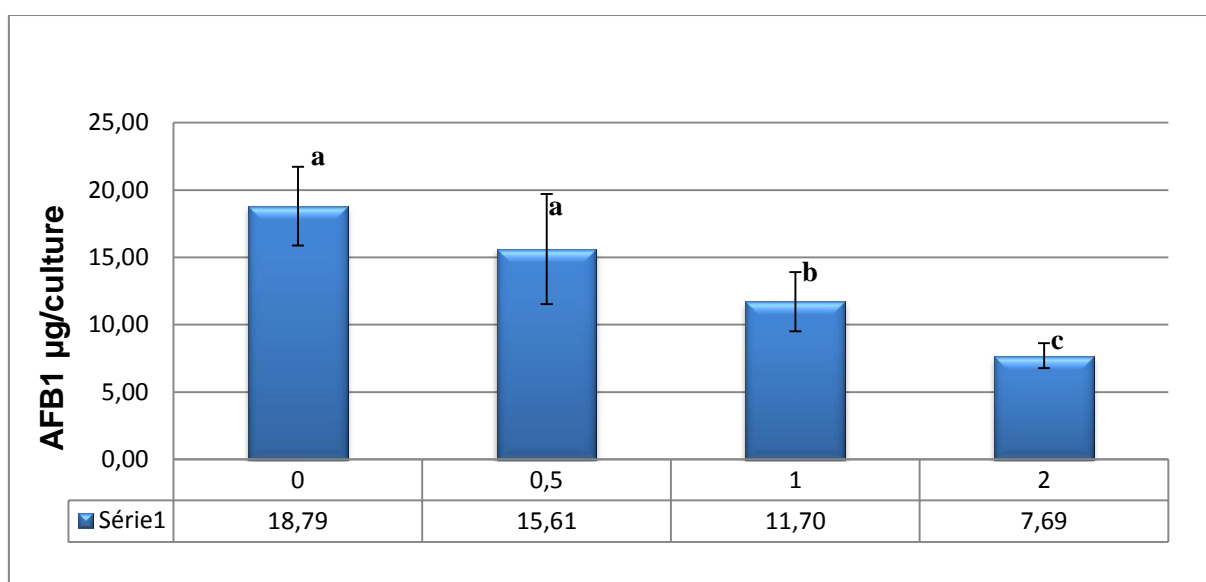


Figure 20 : Impact de concentrations croissantes d'extrait de poivre noir sur la production d'AFB1 par la souche d'*A. minisclerotigenes* E44.

Par contre, l'augmentation des concentrations en poivre ne permet pas d'obtenir une inhibition de la production d'aflatoxine B1 dans la souche NRRL 13137 d'*Aspergillus nomius* qui apparaît donc résistante à cet effet. Au contraire, pour cette dernière, l'ajout de poivre entraîne même plutôt une augmentation de la synthèse de mycotoxine.

3.4. Effet sur les autres aflatoxines

Nous avons caractérisé l'impact des extraits aqueux de poivre sur la production des autres aflatoxines (B2, G1). Les résultats regroupés dans le tableau 24 montrent que les extraits aqueux de poivre noir inhibent aussi la synthèse d'AFB2 et d'AFG1. Les % d'inhibition observés sont comparables à ceux mesurés pour l'AFB1 avec une moyenne de 91% pour l'AFB2 et 69,6% pour l'AFG1.

Tableau 24 : Impact d'extraits aqueux de poivre sur la synthèse d'AFB2 et AFG1 par plusieurs espèces d'*Aspergillus* de la section *Flavi*

AFB2 (µg/boîte)			
Souche	0%	0,5%	% inhibition
<i>A. flavus</i> E 51	15 ±3.5	2.5±1.02	84
<i>A. flavus</i> E 71	8 ±1.3	0.2±0.03	98
<i>A. flavus</i> E 78	4.1± 0.3	0.3±0.06	92
AFG1 (µg/boîte)			
Souche	0%	0,5%	% inhibition
<i>A. flavus</i> N	42±11,1	2,6±0,4	94
<i>A. minisclerotigenes</i> E21	5,9±2,5	1.4±0.5	70
<i>A. minisclerotigenes</i> E44	116,9±2,4	46,7±1,4	60
<i>A.parasiticus</i> NRRL4123	452,8± 77,8	249,4±51,9	45
<i>A.parasiticus</i> NRRL 6433	47,1±3	22±3	53
<i>A.pseudotamarii</i> NRRL 25517	0,9±0,07	0,02±0,02	98
<i>A. bombycis</i> NRRL 26010	142.8±49.8	43.4±8.1	68

Il ressort de l'ensemble qu'un extrait aqueux de poivre noir entraîne une inhibition dose-dépendante de la synthèse de l'ensemble des membres de la famille des aflatoxines, pour toutes les souches d'*Aspergillus flavus* et des autres espèces de la section *Flavi* testées, et ceci sans moduler de manière significative la croissance de ces souches.

3.5. Etude du mécanisme d'action des extraits de poivre noir

3.5.1. Effet du poivre sur le stress oxydatif

Nous avons évalué l'effet du poivre sur plusieurs marqueurs du stress oxydatif : quantité de glutathion (GSH), activité de la superoxyde dismutase (SOD) et activité de la catalase (CAT).

Ces analyses ont permis de montrer que l'ajout d'extrait aqueux de poivre dans le milieu de culture entraîne une diminution dose dépendant de l'activité de la catalase et une augmentation concomitante de la quantité de glutathion (figure 22).

Par contre, les extraits de poivre n'ont aucun effet significatif sur l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) (figure 21).

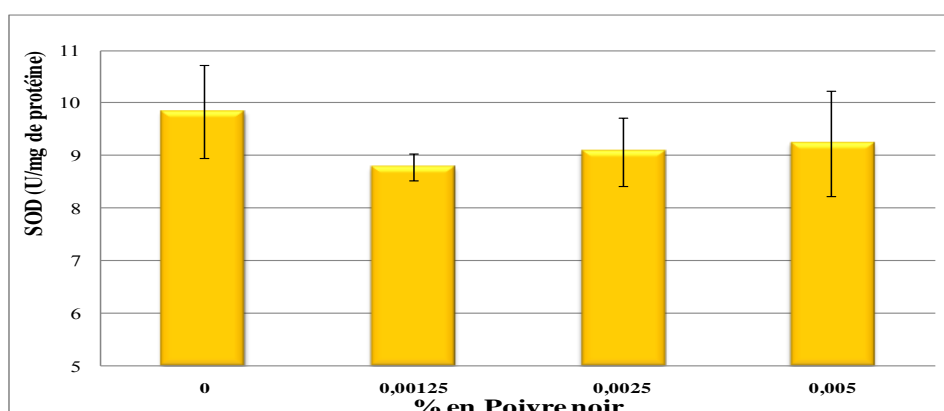


Figure 21: Activité de la SOD de la souche *Aspergillus flavus* après 8 jours d'incubation en présence de concentrations croissantes d'extrait de poivre.

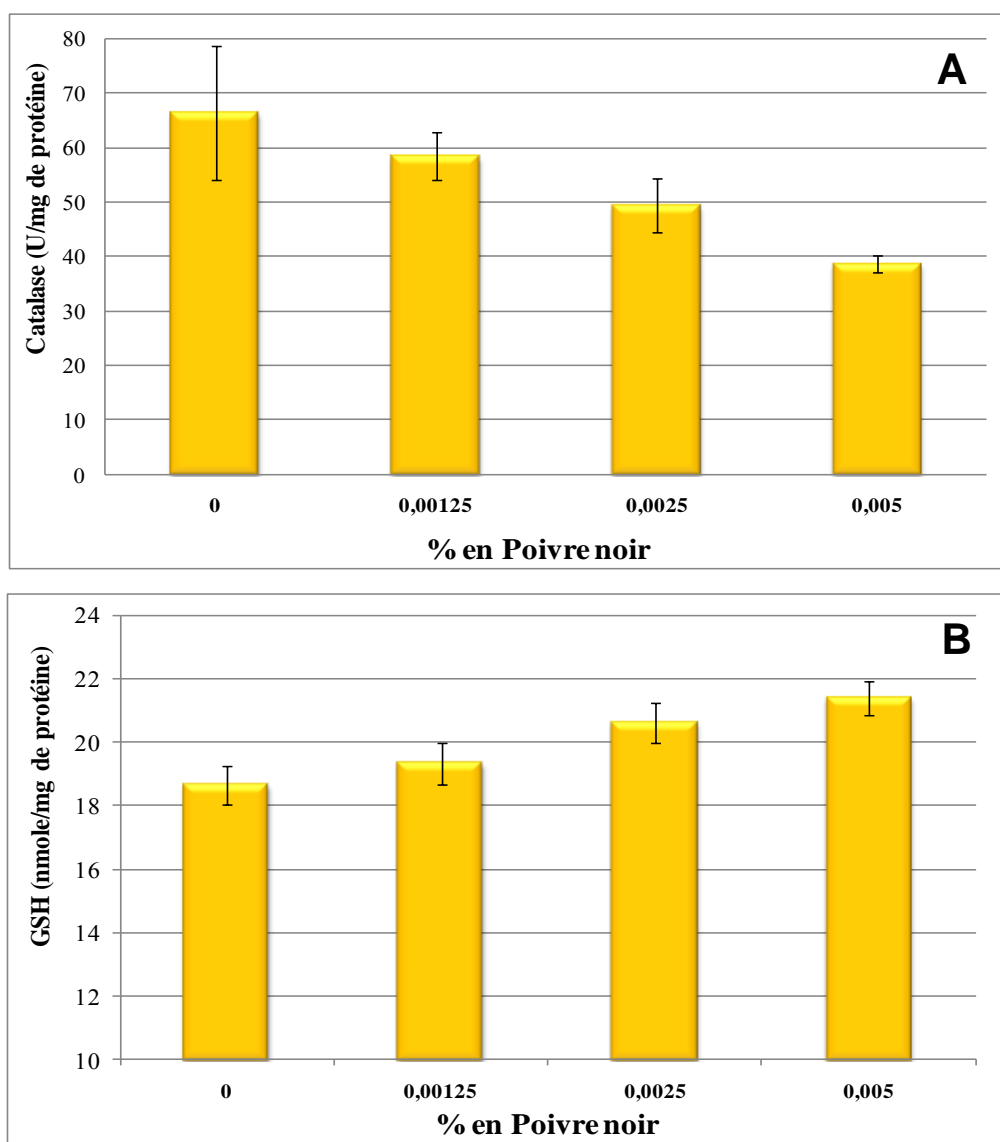


Figure 22: Activité de la Catalase (figure A) et quantité du glutathion (GSH) (figure B) après 8 jours de culture de la souche d'*Aspergillus flavus* en présence de concentrations croissantes d'extrait de poivre.

3.5.2. Identification du niveau de blocage de la voie de synthèse

Afin d'identifier le niveau de blocage auquel interviennent les extraits de poivre noir, nous avons étudié leur effet sur la production de certains intermédiaires stables de la voie de biosynthèse : l'acide norsolorinique et la stérigmatocystine.

3.5.2.1. Effet des extraits sur la synthèse d'acide norsolorinique

Pour étudier l'impact des extraits de poivre sur la synthèse d'acide norsolorinique, nous avons utilisé une souche d'*Aspergillus parasiticus* mutante pour laquelle la voie de biosynthèse est bloquée au niveau de la production du NOR : *Aspergillus parasiticus* NRRL 6111(Papa, 1982).

La figure 23 montre l'impact d'extraits aqueux de poivre noir sur la production d'acide norsolorinique. Il apparaît que l'addition de concentrations croissantes de poivre jusqu'à 2% dans le milieu de culture n'entraîne pas de modification significative de la production de NOR. Ce constat semble montrer que l'effet des extraits est situé plus tardivement, en aval de la production de NOR.

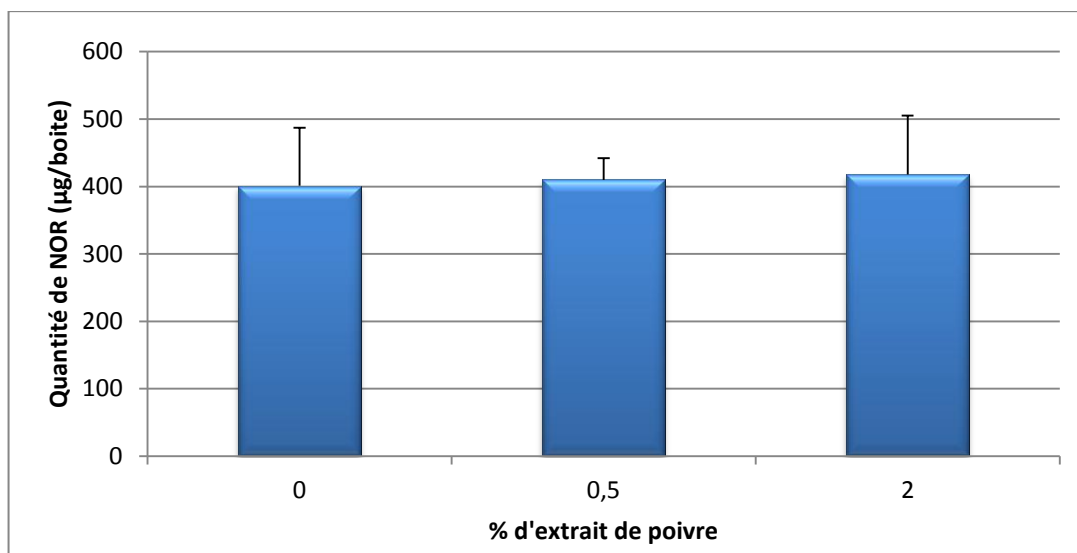


Figure 23: Impact des extraits de poivre noir sur la production de NOR par la souche mutante d'*A. parasiticus* NRRL 6111

3.5.2.2. Effet des extraits sur la synthèse de stérigmatocystine

Pour étudier l'effet des extraits de poivre sur la production de stérigmatocystine, nous avons utilisé deux espèces fongiques pour lesquelles ce composé est le dernier de la voie de biosynthèse: *Aspergillus versicolor* et *Aspergillus nidulans* (Lou *et al.*, 1994).

La figure 24 montre que l'ajout d'extrait de poivre de 0,5% et 2% d'extrait de poivre dans le milieu de culture n'entraîne pas d'augmentation significative de la

concentration en stérigmatocystine chez *Aspergillus nidulans* ni chez *Aspergillus versicolor*. Pour ces deux espèces, les extraits aqueux de poivre ne modifient pas non plus de façon significative la croissance des souches testées (tableau 25).

Ces résultats semblent montrer que l'impact des extraits de poivre se situe en aval de la production de stérigmatocystine. En effet, aucun blocage de la production de cette toxine n'a été observé.

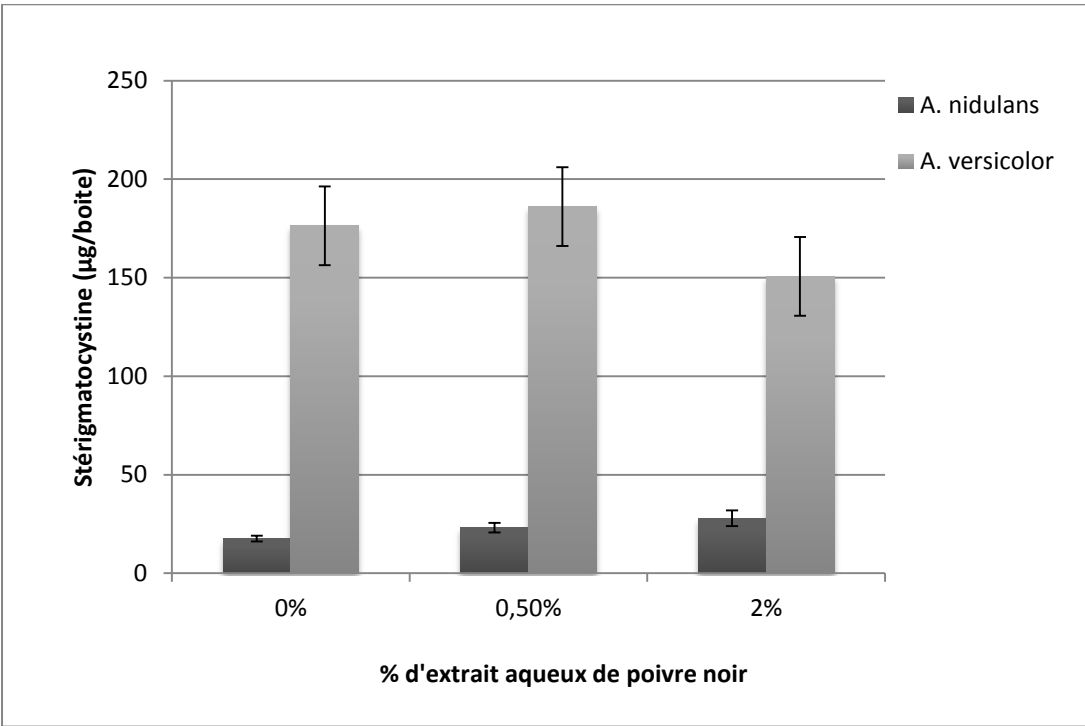


Figure 24 : Impact de concentrations croissantes d'extrait de poivre sur la production de stérigmatocystine après 8 jours d'incubation

Tableau 25 : Impact d'extraits aqueux de poivre sur la croissance fongique après 8 jours d'incubation

Souche	Diamètre des colonies (mm)		
	0%	0.5%	2%
<i>A.nidulans</i>	53,5±1,3	56,3±1,1	54,5±1.3
<i>A.versicolor</i>	22±0,7	25,3±0,6	26,5±1.7

3.5.2.3. Effet des extraits sur la production d'acide cyclopiazonique

Afin de confirmer que l'effet des extraits de poivre observé se situe tardivement dans la voie de biosynthèse des aflatoxines, nous avons étudié l'effet des extraits de poivre noir sur la production d'acide cyclopiazonique, autre mycotoxine produite par *Aspergillus flavus* NRRL 62477. La synthèse de cette mycotoxine nécessite les mêmes précurseurs que la synthèse d'AFB1 (acétate) mais suit des voies métaboliques différentes.

La figure 25 montre l'effet du traitement par des concentrations croissantes d'extrait de poivre noir sur la production de cette toxine. Aucune différence significative n'a pu être observée dans la production d'acide cyclopiazonique, quelles que soient les concentrations d'extrait de poivre.

Ces résultats semblent donc confirmer que l'inhibition de la toxinogénèse induite par les extraits de poivre noir est spécifique de la voie de biosynthèse des aflatoxines et située relativement tardivement (pas de modification de la présence des précurseurs communs à la synthèse d'aflatoxine et d'acide cyclopiazonique).

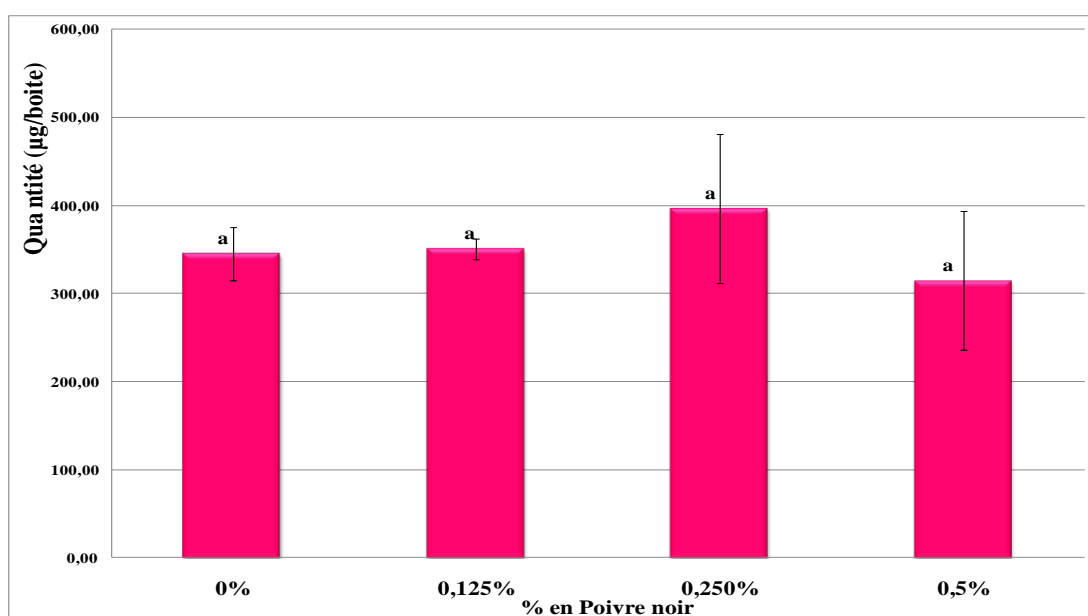


Figure 25: Production d'acide cyclopiazonique (ACP) par la souche d'*A.flavus* NRRL62477 après 8 jours d'incubation en fonction de la concentration en extrait de poivre.

3.6. Caractérisation de la (les) molécule(s) responsable(s)

Afin d'identifier la molécule responsable de l'effet des extraits de poivre noir, nous avons, dans un premier temps, quantifié la teneur en pipérine de nos extraits aqueux. Comme attendu, le dosage par HPLC-MS de la pipérine dans la solution aqueuse de poivre noir a montré une concentration très faible de cette molécule, d'environ 40 µg/ml de pipérine, ce qui correspond à la limite de solubilité de cette molécule dans l'eau.

A partir de ces dosages, il a été déterminé que l'ajout de 0,5 % d'extrait de poivre noir dans le milieu de culture correspond à l'addition de 16 µg de pipérine dans la boîte de Petri, et que l'ajout de 2 % d'extrait aqueux correspond à une quantité de 64 µg de pipérine. Ces concentrations de pipérine apparaissent plus faibles que celles rapportées dans la bibliographie comme ayant un effet inhibiteur sur la synthèse d'AFB1 (140 µg/boîte de Petri dans les travaux de Lee *et al.*, 2002).

3.6.1. Effet de la pipérine sur la production d'aflatoxine B1

Les effets sur la synthèse d'AFB1 de la pipérine d'une part, et de l'extrait aqueux de poivre noir d'autre part, ont été comparés après respectivement 4 et 8 jours de culture. Les résultats, exprimés en % de la production d'AFB1 par rapport au témoin non traité (T), à des concentrations en pipérine équivalentes, sont montrés sur les figures 26 et 27 respectivement.

Ces résultats confirment l'effet-dose de la pipérine sur la synthèse d'AFB1 par la souche NRRL 62477 d'*Aspergillus flavus*, après respectivement 4 et 8 jours de culture. La pipérine entraîne une diminution de la synthèse d'AFB1 pour des concentrations supérieures à 64 µg/boîte de Petri. A la concentration de 64 µg/boîte de Petri, l'inhibition de la synthèse d'AFB1 n'apparaît qu'après 8 jours de culture et atteint alors 60 % par rapport au témoin non traité (T). Par comparaison, à teneur en pipérine équivalente, les extraits aqueux de poivre noir ont un effet bien plus important et plus rapide. Par exemple, après 4 jours de culture, l'ajout dans le milieu de culture de 0,125 % d'extrait aqueux de poivre noir (ce qui correspond à une

quantité de pipérine de 4 µg/boîte de Petri) entraîne une inhibition de la synthèse d'AFB1 de 50 % par rapport au témoin non traité, alors que l'ajout de 4 µg de pipérine pure n'a aucun effet. Après 8 jours de culture, l'ajout de 0,5 % d'extrait aqueux de poivre noir entraîne une inhibition de plus de 90 % de la production d'AFB1, alors que l'ajout d'une quantité équivalente de pipérine dans le milieu de culture (16 µg/boîte de Petri) n'a pas d'effet. Ceci démontre que l'effet de l'extrait aqueux de poivre noir n'est pas lié à la présence, à l'état de traces, de la pipérine.

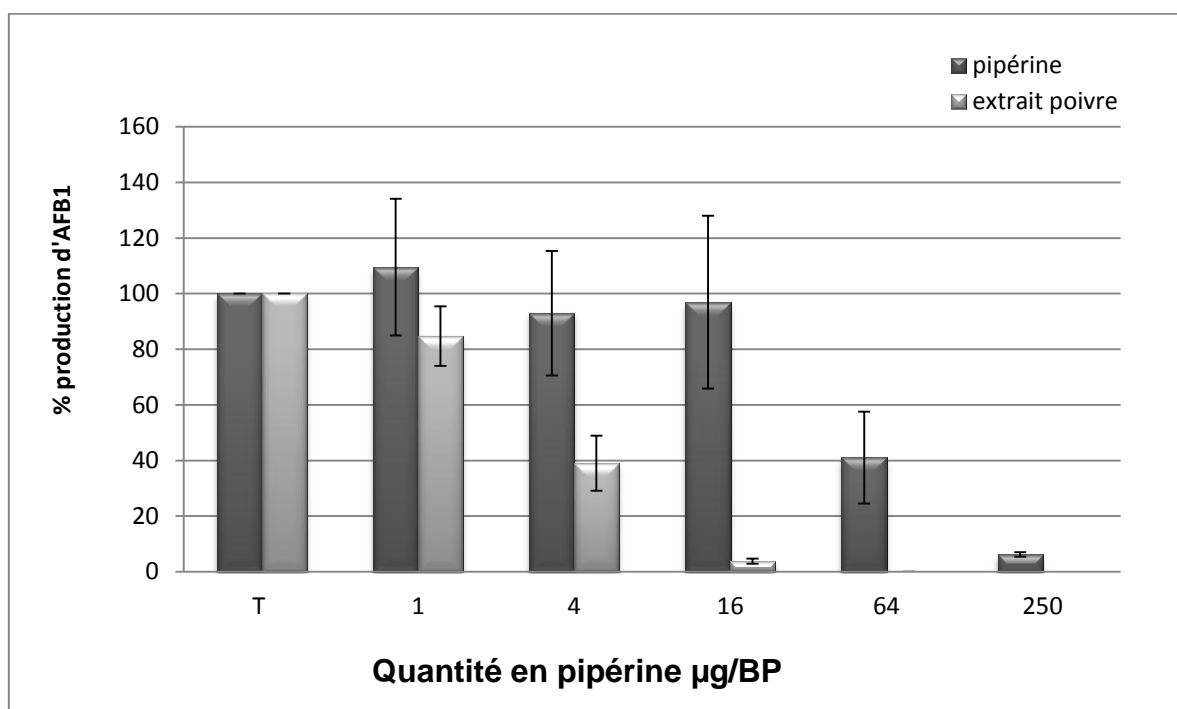


Figure 26 : Production d'aflatoxine B1 (% par rapport au Témoin) par la souche d'*A. flavus* NRRL 62477 en fonction de la quantité de pipérine après 8 jours d'incubation.

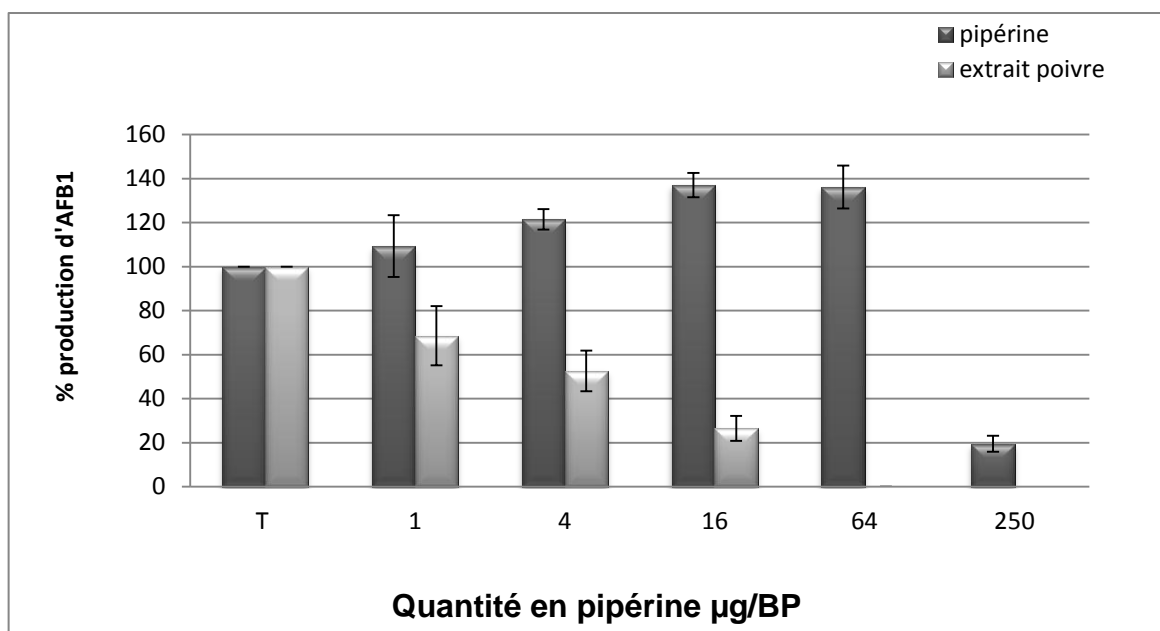


Figure 27 : Production d'aflatoxine B1 (% par rapport au Témoin) par la souche d'*A. flavus* NRRL 62477 en fonction de la quantité de pipérine après 4 jours d'incubation.

Les effets sur la sporulation de la souche NRRL 62477 d'*Aspergillus flavus*, de la pipérine d'une part, et de l'extrait aqueux total de poivre noir d'autre part, ont également été comparés après 8 jours de culture, à des concentrations en pipérine équivalentes. Les résultats, exprimés en nombre de spores, sont montrés sur la figure 28. On constate que la pipérine entraîne une diminution dose-dépendante de la sporulation fongique, alors que cet effet n'est pas observé avec l'extrait aqueux de poivre noir.

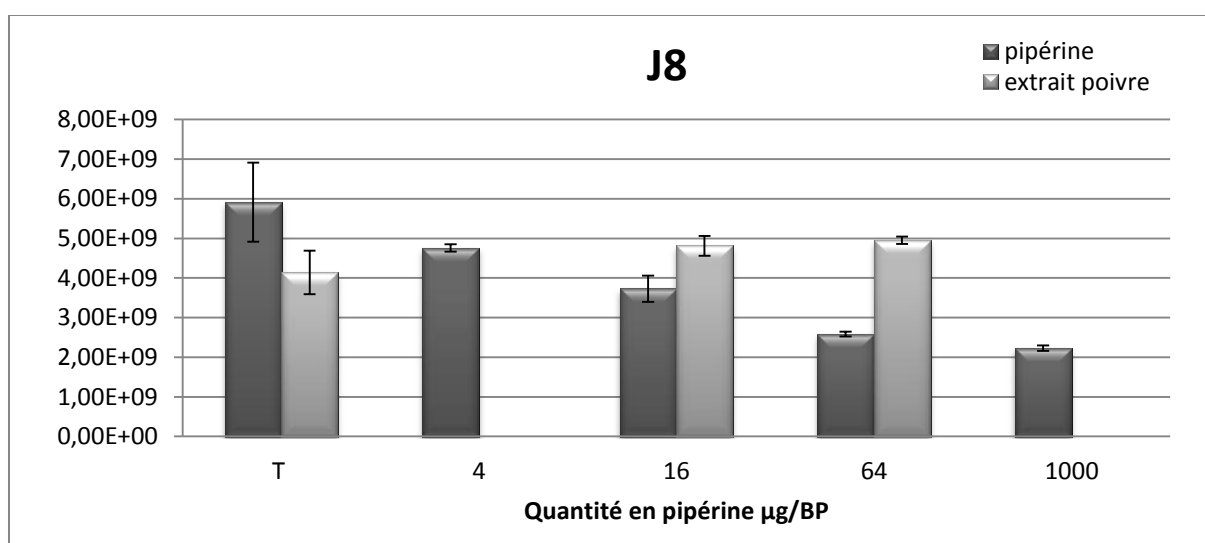


Figure 28: Nombre de spores après culture de la souche d'*Aspergillus flavus* NRRL 62477 pendant 8 jours en présence de différentes quantités de pipérine.

3.6.2. Fractionnement des extraits et effet des différentes fractions sur la synthèse d'aflatoxine B1

L'impact des 10 fractions obtenues après séparation des extraits aqueux de poivre par chromatographie flash sur la synthèse d'AFB1 est montré sur la figure 29. Il apparaît que les fractions F5, F6 et F7 sont particulièrement efficaces, puisqu'elles entraînent une inhibition de plus de 90 % de la production d'aflatoxine B1. En parallèle, la fraction F1 entraîne une inhibition de plus de 45 % de la production d'aflatoxine B1.

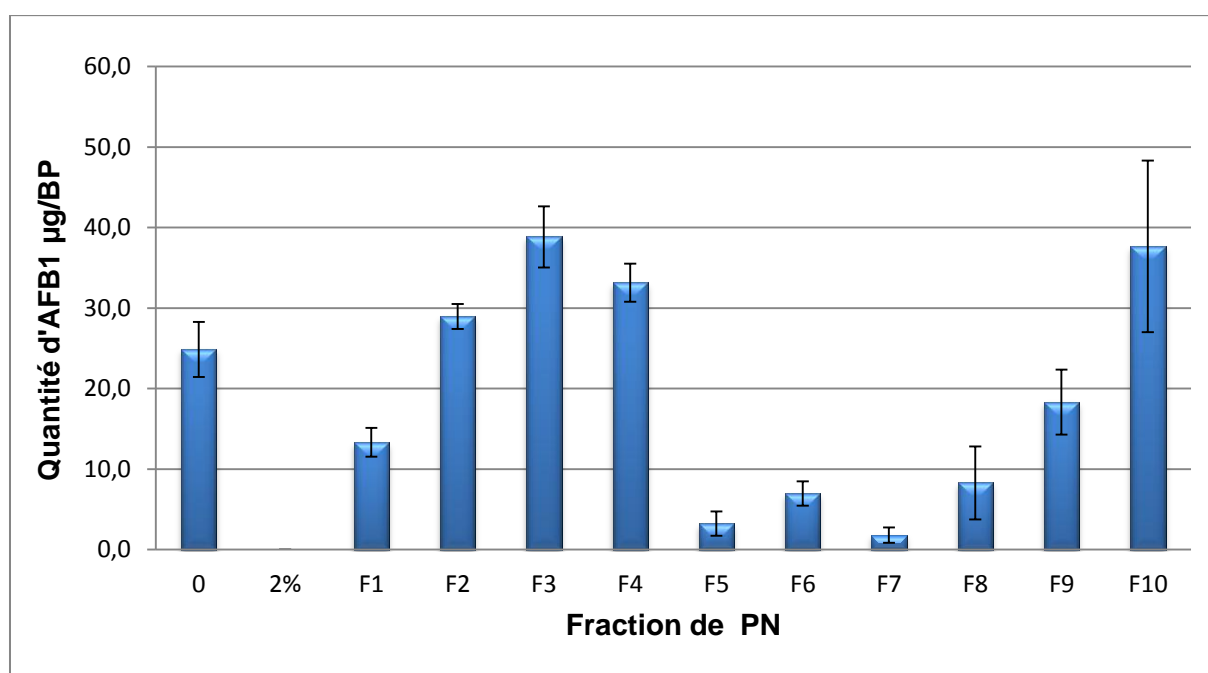


Figure 29 : Production d'AFB1 par la souche NRRL 62477 d'*A.flavus* en présence de 2% de PN et des différentes fractions après 8 jours d'incubation.

La figure 30 montre l'évolution des diamètres des colonies d'*Aspergillus flavus* souche NRRL 62477 cultivée en présence de dix fractions d'extrait aqueux du poivre noir.

Seule la fraction F8 entraîne une diminution de plus de 5% de croissance fongique par rapport au témoin non traité.

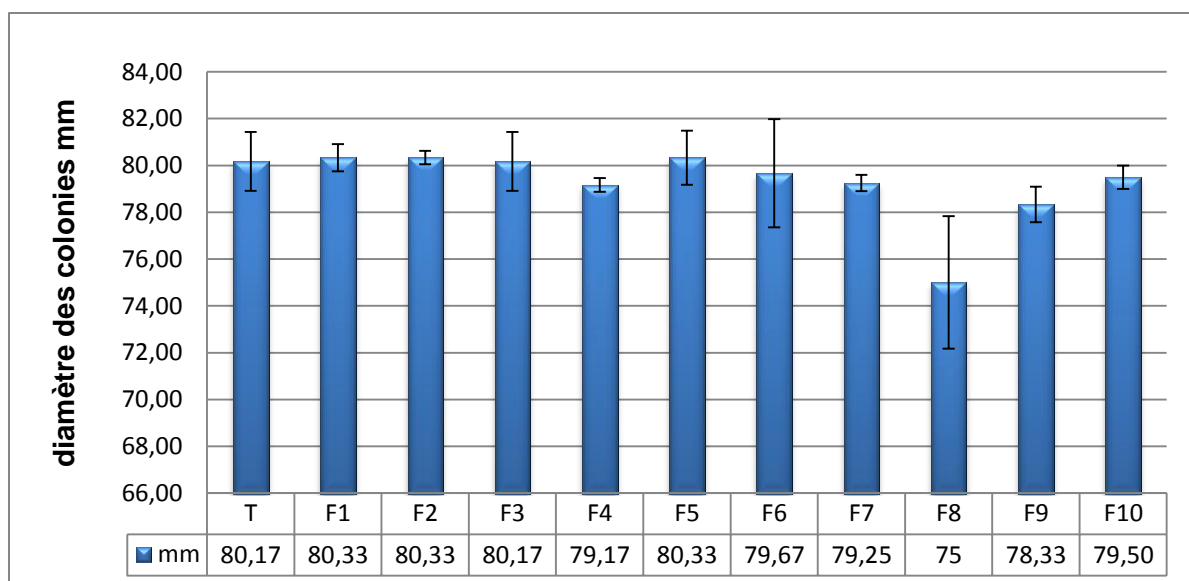


Figure 30 : Diamètre des colonies de la souche d'*Aspergillus flavus* NRRL 62477 après 8 jours de cultures en absence (T) ou en présence des dix fractions obtenues à partir des extraits aqueux de poivre

La présence d'alkaloïdes de type amide a été recherchée par HPLC dans les fractions F5, F6 et F7. L'analyse a permis de montrer que ces fractions ne contiennent pas d'alkaloïdes de type amide, notamment les alcaloïdes suivants : pipérine (cette dernière étant retrouvée dans les fractions F8 et F9), piperlongumine, piperlonguminine, pipernonaline, pipérettine, piperocadécaldine, alkényl pipéridine amide (figure 31).

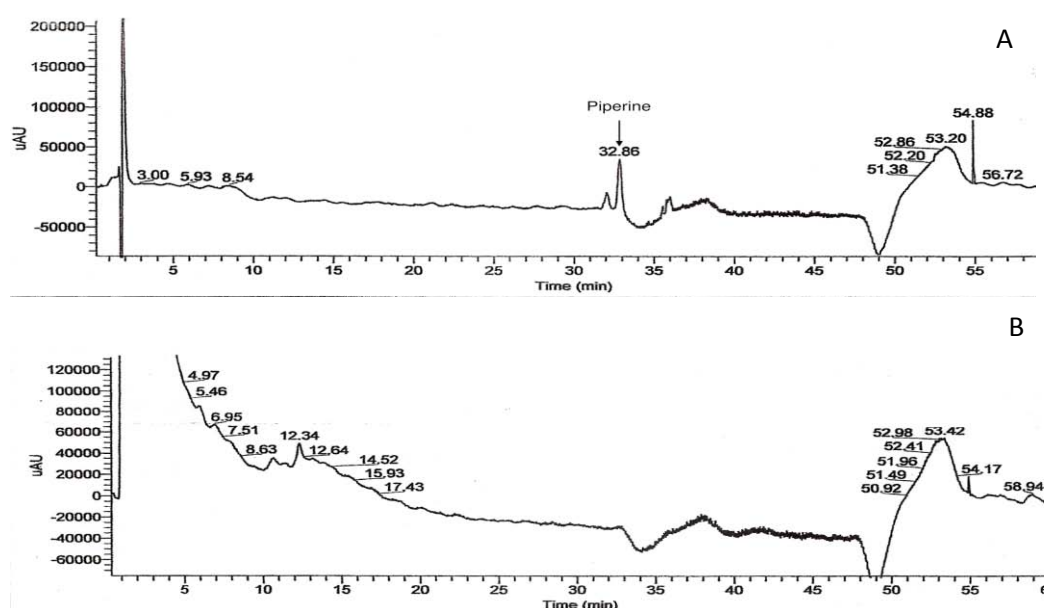


Figure 31 : Chromatogrammes des fractions F8 (A) et F5 (B)

4. Discussion

L'objectif de cette étude était de caractériser l'impact d'extraits aqueux de poivre noir sur la production d'aflatoxine B1 par des souches toxigènes d'*Aspergillus* de la section *Flavi*. En effet, des études antérieures avaient montré que le poivre est fréquemment contaminé par des souches toxigènes appartenant à cette espèce fongique, mais il n'est presque jamais contaminé par les aflatoxines (Fazekas *et al.*, 2005 ; Cho *et al.*, 2008 ; Zinedine *et al.*, 2006 ; El Mahgubi *et al.*, 2013). De plus, certains auteurs ont montré que des alcaloïdes issus du poivre (pipérine, piperlongumine, piperlonguminine, pipernonaline, pipérettine, piperocadécaldine) étaient susceptibles d'inhiber la synthèse d'aflatoxine B1, sans toutefois que le mécanisme d'action de ces composés ne soit identifié (Lee *et al.*, 2002).

Ce travail a mis en évidence dans un premier temps que des extraits aqueux de poivre noir sont capables de moduler négativement la production d'aflatoxine B1, de façon dose dépendante par une souche toxigène d'*Aspergillus flavus* NRRL 62477. L'inhibition est observée à partir d'une concentration de 0,0625% d'extrait de poivre noir. L'addition dans le milieu de culture de concentrations supérieures à 0,5% d'extrait entraîne une inhibition quasi-totale de la synthèse.

La plupart des études visant à identifier des composés inhibiteurs de la synthèse d'AFB1 montrent que les molécules qui agissent sur la synthèse d'AFB1 entraînent en parallèle une modulation négative de la croissance fongique (Holmes *et al.*, 2008). Cependant, dans notre cas, l'effet de l'extrait de poivre sur la synthèse de la mycotoxine n'est pas lié à une modulation de la croissance fongique. En effet, les extraits n'entraînent pas de changement significatif de la vitesse de croissance, de la sporulation et ne modifient pas la synthèse d'ergostérol ou de protéines aux concentrations actives.

L'extrait aqueux de poivre noir entraîne une inhibition de la synthèse d'AFB1 dans toutes les espèces toxigènes d'*Aspergillus* de la section *Flavi* étudiées (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus bombycis*, *Aspergillus pseudotamarii* et *Aspergillus minisclerotigenes*), à l'exception d'*A. nomius*. Dans tous les cas, l'effet sur la synthèse mycotoxique ne s'accompagne pas d'inhibition significative de la croissance fongique.

Afin d'avancer dans la compréhension du mécanisme d'action responsable de cette inhibition, nous avons, dans un premier temps évalué l'impact des extraits aqueux de poivre noir sur un certain nombre de marqueurs de stress oxydatif.

En effet, il a été démontré que le stress oxydant était un paramètre important susceptible de réguler la production de l'AFB1. Ainsi, des molécules comme l'eugénol ou l'éthylène inhibent la synthèse d'aflatoxine B1 en modulant négativement le stress oxydatif (Jayashree et Subramanyam, 1999 ; Huang *et al.*, 2009). Inversement l'augmentation du stress oxydant dans l'environnement des souches fongiques toxigènes stimule la production de toxine (Huang *et al.*, 2008 ; Jayashree et Subramanyam, 2000 ; Narasaiah et al., 2006). Le poivre noir étant connu pour son pouvoir antioxydant (Gulcin, 2005), nous avons évalué le rôle du stress oxydatif dans l'inhibition de la production d'aflatoxine B1.

Nous avons montré que la superoxyde dismutase n'est pas modifiée par l'ajout d'extrait aqueux de poivre noir dans le milieu de culture. L'activité de la catalase diminue de 40%, alors que le glutathion augmente légèrement mais de façon dose-dépendante en présence de poivre (+20%). Ces résultats semblent montrer que l'action antioxydante des extraits de poivre n'est probablement pas seule responsable de l'effet observé sur la production d'aflatoxine B1. En effet, dans les études antérieures ayant montré une relation entre pouvoir antioxydant des molécules et inhibition de l'AFB1, les effets rapportés sont beaucoup plus importants que ceux que nous avons observés. Ainsi, l'eugénol, aux doses inhibant la synthèse d'AFB1, diminue l'activité de la superoxyde dismutase d'un facteur 3 par rapport aux contrôles (Jayashree et Subramanyam, 1999). De même, la N-acétyl-Cystéine multiplie la teneur en GSH par 4 par rapport aux contrôles non traités (Huang *et al.*, 2008). Aucune donnée n'est disponible quant à l'évolution de l'activité catalase de souches fongiques en présence d'agents antioxydants inhibiteurs de la synthèse d'AFB1.

Afin de localiser le niveau de blocage de la voie de biosynthèse lié à l'action des extraits aqueux de poivre, nous avons quantifié l'effet sur la production d'acide norsolorinique, premier intermédiaire stable de la voie de biosynthèse de l'aflatoxine B1, par une souche mutante d'*A. parasiticus*. Nous avons montré que les extraits n'entraînent pas de modification de la production de NOR. Ce constat laisse penser que l'effet est donc situé plus tardivement, en aval de la production de NOR.

Nous avons ensuite mesuré l'effet sur la production de stérigmatocystine, intermédiaire tardif de la voie de biosynthèse de l'aflatoxine B1, dans deux espèces fongiques (*Aspergillus nidulans* et *Aspergillus versicolor*). Nous avons montré que les extraits aqueux de poivre ne modifient pas la synthèse de stérigmatocystine dans ces espèces fongiques, ce qui suggère que le niveau d'action des molécules actives se situe après la stérigmatocystine, très tardivement dans la voie de biosynthèse des aflatoxines.

Ceci est en accord avec l'absence d'effet significatif de ces molécules sur le stress oxydant. En effet, lorsque l'inhibition est associée à une modification de l'environnement de la souche fongique, elle entraîne un blocage de la biosynthèse des aflatoxines beaucoup plus précoce, plus généralement avant la synthèse de NOR, premier intermédiaire stable dans la synthèse des aflatoxines (Holmes *et al.*, 2008 ; Jermnak *et al.*, 2012 ; Norton, 1997 ; Yoshinari *et al.*, 2007).

Afin d'apprécier la spécificité de l'inhibition observée, nous avons aussi mesuré l'effet des extraits de poivre sur la production d'acide cyclopiazonique par notre souche d'*Aspergillus flavus* toxigène. Nous avons montré que ces extraits n'ont aucun effet sur la production de cette toxine dont la synthèse se fait par une voie métabolique distincte de celle impliquée dans la production des aflatoxines.

D'autres molécules naturelles ont déjà été identifiées comme capable d'interférer tardivement et spécifiquement avec la voie de biosynthèse de ces mycotoxines. Ainsi, des spiroethers (Yoshinari *et al.*, 2008), ainsi que le dillapiol (Razzaghi *et al.*, 2007), extraits respectivement de la camomille et de l'aneth, sont capables d'inhiber spécifiquement la synthèse d'aflatoxine G1 en bloquant l'activité de l'enzyme NadA nécessaire pour convertir l'orthométhyl-stérigmatocystine en aflatoxine G1 (Cai *et al.*, 2008), et ce, sans modifier la croissance fongique. Une autre étude a montré que les molécules antiaflatoxinogènes comme le 5-azacytidine inhibe la production d'AFB1, en agissant après la production de stérigmatocystine par inhibition du gène *aflP* (Lin *et al.*, 2012). Il est donc possible que nos extraits aqueux contiennent une molécule susceptible d'inhiber spécifiquement l'une des étapes permettant la conversion de la stérigmatocystine en aflatoxine B1. Il est aussi possible qu'ils interviennent encore plus tardivement, en modifiant par exemple le transport de la toxine vers le milieu extérieur et entraînant alors un rétrocontrôle négatif de la synthèse. En effet, il a été montré que le dernier intermédiaire de la voie de synthèse est transporté dans des vésicules

spécialisées, appelées aflatoxisomes, qui permettent la coordination des étapes catalytiques nécessaires à l'exportation de l'AFB1 hydrophobe. Si une telle structure n'est pas en mesure de se former correctement dans les cellules, les enzymes impliquées dans la biosynthèse ne peuvent catalyser la formation d'AFB1 (Wilkinson et al., 2011).

Deux études antérieures avaient montré un effet inhibiteur du poivre noir sur la production d'AFB1 (Madhyastha et Bhat, 1984 ; Lee *et al.*, 2002), et des alcaloïdes présents dans le poivre avaient été identifiées comme les molécules actives responsables de cet effet. Ainsi, il a été montré que la pipérine est capable de moduler négativement la synthèse d'AFB1. Cependant, cet effet est observé à une concentration en piperine supérieure à celle observée dans les extraits aqueux actifs (la pipérine est un composé liposoluble). De plus, cet effet s'accompagne d'une inhibition de la croissance d'environ 40% (Lee *et al.*, 2002). Le fractionnement des extraits de poivre noir a permis de montrer que les fractions actives ne contiennent pas de piperine et que, par conséquent, cette molécule n'est pas responsable de l'effet anti-aflatoxinogène des extraits aqueux de poivre noir. Là où les molécules responsables semblent majoritairement présentes dans les fractions 5, 6 et 7 et leur nature exacte reste à identifier.

5. Conclusion et perspectives

Nos travaux ont donc permis de montrer que des extraits aqueux de poivre noir permettent de réduire la synthèse d'aflatoxines par des souches d'*Aspergillus* toxinogènes, sans moduler la croissance fongique.

Afin de poursuivre les travaux engagés, plusieurs pistes doivent être explorées :

- Caractérisation du mécanisme d'action des extraits aqueux

Nos travaux laissent penser que les extraits interviennent tardivement dans la voie de biosynthèse, en aval de la production de stérigmatocystine. Afin d'avancer dans la compréhension du mécanisme d'action mis en jeu, il semble nécessaire d'étudier l'impact de ces extraits sur l'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse. Ces travaux sont en cours et visent à étudier l'expression de gènes régulateurs, situés à différents niveaux de la voie de synthèse de l'AFB1.

- Identification de la molécule active

Si nos travaux ont permis de montrer que l'effet observé sur la synthèse d'AFB1 n'était pas dû aux alcaloïdes du poivre tels que la pipérine ou la piperlongumine, il reste désormais à identifier le ou les composés actifs. Pour cela, une séparation fine des fractions actives devrait permettre d'identifier les composés actifs et, ensuite, de déterminer leur nature exacte.

- Effet des extraits aqueux de poivre sur d'autres mycotoxines

Les extraits aqueux de poivre noir entraînent une inhibition de la synthèse des aflatoxines. Même si ils n'ont pas d'effet sur la synthèse d'acide cyclopiazonique, il semble important de caractériser leur effet sur la synthèse d'autres mycotoxines importantes telles que l'ochratoxine A ou les fusariotoxines. En effet, les voies de biosynthèse de certaines de ces molécules peuvent présenter des similitudes avec celles de l'AFB1 et ainsi être, elles aussi, sensibles à l'effet des extraits aqueux de poivre noir.

Références bibliographiques

- Abbas, H.K., Accinelli, C., Zablotowicz, R.M., Abel, C.A., Bruns, H.A., Dong, Y., and Shier, W.T. (2008). Dynamics of mycotoxin and *Aspergillus flavus* levels in aging Bt and non-Bt corn residues under Mississippi no-till conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7578–7585.
- Abbas, H.K., Zablotowicz, R.M., Bruns, H.A., and Abel, C.A. (2006). Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Science and Technology* 16, 437–449.
- Abdulkadar, A.H., Al-Ali, A., and Al-Jedah, J. (2000). Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. *Food Control* 11, 157–160.
- Abdulkadar, A.H., Al-Ali, A.A., Al-Kildi, A.M., and Al-Jedah, J.H. (2004). Mycotoxins in food products available in Qatar. *Food Control* 15, 543–548.
- AFSSA (2009): Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale.
- Arora R. G., Frolen H., Nilsson A. (1981). Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. *Ada. Vet. Scand.*, 1981, 22, 524-534.
- Asao, T., Buchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., and Wogan, G.N. (1963). Aflatoxins B and G. *J. Am. Chem. Soc* 85, 1706–1707.
- Atehnkeng, J., Ojiambo, P.S., Ikotun, T., Sikora, R.A., Cotty, P.J., and Bandyopadhyay, R. (2008). Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. *Food Additives & Contaminants: Part A* 25, 1264–1271.
- Athnasios, A.K., and Kuhn, G.O. (1977). Improved thin layer chromatographic method for the isolation and estimation of sterigmatocystin in grains. *J Assoc Off Anal Chem* 60, 104–106.
- Aydin, A., Emin Erkan, M., Başkaya, R., and Ciftcioglu, G. (2007). Determination of Aflatoxin B1 levels in powdered red pepper. *Food Control* 18, 1015–1018.
- Bailly, J.D., Le Bars, P., Pietri, A., Benard, G., and Le Bars, J. (1999). Evaluation of a fluorodensitometric method for analysis of ergosterol as a fungal marker in compound feeds. *J. Food Prot.* 62, 686–690.

- Bailey, G.S., Williams, D.E., Wilcox, J.S., Loveland, P.M., Coulombe, R.A., and Hendricks, J.D. (1988). Aflatoxin B1 carcinogenesis and its relation to DNA adduct formation and adduct persistence in sensitive and resistant salmonid fish. *Carcinogenesis* 9, 1919–1926.
- Bandyopadhyay, R., Kumar, M., and Leslie, J.F. (2007). Relative severity of aflatoxin contamination of cereal crops in West Africa. *Food Additives and Contaminants* 24, 1109–1114.
- Bankole, S.A., Adenusi, A.A., Lawal, O.S., and Adesanya, O.O. (2010). Occurrence of aflatoxin B1 in food products derivable from “egusi” melon seeds consumed in southwestern Nigeria. *Food Control* 21, 974–976.
- Battaccone, G., Nudda, A., Rassu, S.P.G., Decandia, M., and Pulina, G. (2012). Excretion pattern of aflatoxin M1 in milk of goats fed a single dose of aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science* 95, 2656–2661.
- Bennett, J.W., Chang, P.-K., and Bhatnagar, D. (1997). One Gene to Whole Pathway: The Role of Norsolorinic Acid in Aflatoxin Research. In *Advances in Applied Microbiology* 45, 1–15.
- Bennett, J.W and Klich, M. (2003) mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 497–516
- Bhat, R., Rai, R.V., and Karim, A.A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9, 57–81.
- Bhatnagar D., Payne G.A., Cleveland T.E. and Robens J.F.(2004). Mycotoxins: Current issues in USA. In: *Meeting the mycotoxin menace*, Barug D., van Egmond H., López-García R., van Osenbruggen T. and Visconti A. (eds). Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, p. 17-47.
- Blount, W. P. (1961). Turkey “X” disease. *J. Br. Turkey Fed.* 9, 55–58. Bhat, R., Rai, R.V., and Karim, A.A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9, 57–81.
- Bokhari, F., and Aly, M.M. (2009). Trials towards reduction of fungal growth and aflatoxin G1 production in Arabic coffee using different additives. *African Journal of Food Science* 3, 068–076.
- Bonjar G.H.S. (2004). Incidence of aflatoxin producing fungi in early split pistachio nuts of Kerman, Iran. In: *Journal of Biological Sciences*, 4, 199-202.

- Botton, A. Breton, M. Fevre, S. Gauthier, Ph. GUY, J.P. Larrent, P. Reymond, J.J.Sanglier,Y. Vayssier, P. Veau.(1990). Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. Masson deuxième édition ., Paris.
- Boudra, H., Barnouin, J., Dragacci, S., and Morgavi, D.P. (2007). Aflatoxin M 1 and Ochratoxin A in Raw Bulk Milk from French Dairy Herds. *Journal of Dairy Science* 90, 3197–3201.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brekke, O.L., Sinnhuber, R.O., Peplinski, A.J., Wales, J.H., Putnam, G.B., Lee, D.J., and Ciegler, A. (1977). Aflatoxin in corn: ammonia inactivation and bioassay with rainbow trout. *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 34–37.
- Brown, R.L., Cotty, P.J., Cleveland, T.E., and others (1991). Reduction in aflatoxin content of maize by atoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *J. Food Prot* 54, 623–626.
- Bryden, W.L. (2007). Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pac J Clin Nutr* 16, 95-101.
- Buchanan RL, Hoover DG, Jones SB (1983) Caffeine inhibition of aflatoxin production—mode of action. *Appl Environ Microbiol* 46:1193–1200
- Busby, W. F., Jr, & Wogan, G. N. (1984) in *Chemical Carcinogenesis* (Searle, C. E., Ed.) American Chemical Society, Washington, DC 2, 945-1 136.
- Cahagnier, B., Dragaci, S., Frayssinet, C., Frémy, J.M., Hennebert, G.L., Lesage-meessen, L., Multon, J.L., Richard-Molard, D., Roquebert, M.F. (1998). Moisissures des aliments peu hydratés. Lavoisier Tec&Doc. France.
- Cai, J., Zeng, H., Shima, Y., Hatabayashi, H., Nakagawa, H., Ito, Y., Adachi, Y., Nakajima, H., and Yabe, K. (2008). Involvement of the *nadA* gene in formation of G-group aflatoxins in *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics and Biology* 45, 1081–1093.
- Carbone, I., Ramirez-Prado, J.H., Jakobek, J.L., and Horn, B.W. (2007). Gene duplication, modularity and adaptation in the evolution of the aflatoxin gene cluster. *BMC Evolutionary Biology* 7, 111.
- Cary, J.W., Ehrlich, K.C., Wright, M., Chang, P.K. & Bhatnagar, D. (2000). Generation of *aflR* disruption mutants of *Aspergillus parasiticus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 680-684.

- Cary, J. F.; Harris, P. Y.; Molyneux, R. J. & Mahoney, N.E. (2003). Inhibition of aflatoxin biosynthesis by gallic acid. In: Proceedings of the 3rd Fungal Genomics, 4th Fumonisin, and 16th Aflatoxin Elimination Workshop. 13–15 October, 2003, Savannah, GA., p 51.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2004). Outbreak of aflatoxin poisoning-Eastern and Central provinces, Kenya. MMWR. January– July 2004; 53: 790-793.
- Chala, A., Mohammed, A., Ayalew, A., and Skinnes, H. (2013). Natural occurrence of aflatoxins in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) from eastern Ethiopia. Food Control 30, 602–605.
- Chang, P.K. (2003). The *Aspergillus parasiticus* protein AFLJ interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator AFLR. Molecular Genetics and Genomics 268, 711–719.
- Chang, P.K. (2004). Lack of interaction between AFLR and AFLJ contributes to nonaflatoxigenicity of *Aspergillus sojae*. Journal of Biotechnology 107, 245–253.
- Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Yu, J., Bhatnagar, D., and Cleveland, T.E. (1995). Increased expression of *Aspergillus parasiticus* aflR, encoding a sequence-specific DNA-binding protein, relieves nitrate inhibition of aflatoxin biosynthesis. Applied and Environmental Microbiology 61, 2372–2377.
- Charmley, L.L., Trenholm, H.L., Prelusky, D.B., and Rosenberg, A. (1995). Economic losses and decontamination. Natural Toxins 3, 199–203.
- Chaudhary, A.C.A., and Chaudhary, S.C.S.C.S. (2012). Recent developments in host plant resistance strategy of aflatoxin accumulation in crops. Acta Biologica Indica 1, 17–26.
- Chipley JR, Uraih N (1980) Inhibition of *Aspergillus* growth and aflatoxin release by derivatives of benzoic-acid. Appl Environ Microbiol 40:352–357
- Cho, S., Lee, C., Jang, M., Son, Y., Lee, S., Choi, I., Kim, S., and Kim, D. (2008). Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. Food Chemistry 107, 1283–1288.
- Chun, H.S., Kim, H.J., Ok, H.E., Hwang, J.B., and Chung, D.H. (2007). Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. Food Chemistry 102, 385–391.
- Colak, H., Bingol, E.B., Hampikyan, H., and Nazli, B. (2006). Determination of aflatoxin contamination in red-scaled, red and black pepper by ELISA and HPLC. Journal of Food and Drug Analysis 14, 292–296.

- Cotty, P. (1988). Aflatoxin and sclerotial production by *Aspergillus flavus*: influence of pH. *Phytopathology* 78:1250–1253.
- Cotty P.J. (1997). Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. *Mycol. Res.* 101:698–704.
- Cotty, P.J. (1990). Effect of Atoxigenic Strains of *Aspergillus flavus* on Aflatoxin Contamination of Developing Cottonseed. *Plant Disease* 74, 233.
- Diaz, D.E., Hagler, W.M., Jr, Hopkins, B.A., and Whitlow, L.W. (2002). Aflatoxin binders I: in vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. *Mycopathologia* 156, 223–226.
- Ding, X., Li, P., Bai, Y., and Zhou, H. (2012). Aflatoxin B1 in post-harvest peanuts and dietary risk in China. *Food Control* 23, 143–148.
- Do, J.H., and Choi, D.K. (2007). Aflatoxins: detection, toxicity, and biosynthesis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12, 585–593.
- Dollear, F., Mann, G., Codifer, L., Gardner, H., Koltun, S., and Vix, H. (1968). Elimination of aflatoxins from peanut meal. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 45, 862–865.
- Dorner, Joe W, Richard J. Cole. (2002). Effect of application of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. *Journal of Stored Products Research* 38, 329–339
- Draughon, F.A., and Ayres, J.C. (1981). Inhibition of aflatoxin production by selected insecticides. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 972–976.
- Du, W., Obrian, G.R., and Payne, G.A. (2007). Function and regulation of aflJ in the accumulation of aflatoxin early pathway intermediate in *Aspergillus flavus*. *Food Additives and Contaminants* 24, 1043–1050.
- Duarte, S.C., Sun, P., Wang, J.Q., Zhen, Y.P., Han, R.W., and Xu, X.M. (2013). Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal Exposure. *Food Control* 30, 411–417.
- Duverger, F., Bailly, S., Querin, A., Pinson-Gadais, L., Guerre, P., and Bailly, J. (2011). Influence of culture medium and incubation time on the simultaneous synthesis of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum*. *Revue Méd. Vét* 162, 93–97.

- Duthie, I.F., Lancaster, M.C., Taylor, J., Thomas, D.C., Shacklady, C.A., Attfield, P.H., and Fuller-Lewis, E. (1966). Toxic groundnut meal in feeds for pigs. A trial made at two laboratories with pigs from about 40 to 200 lb. live-weight fed to a restricted scale. *Veterinary Record* 79, 621–625.
- Eaton D.L., Groopman J.D.(1994). *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. San Diego: Academic Press.
- Edrington, T.S., Sarr, A.B., Kubena, L.F., Harvey, R.B., and Phillips, T.D. (1996). Hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS), acidic HSCAS, and activated charcoal reduce urinary excretion of aflatoxin M1 in turkey poult. Lack of effect by activated charcoal on aflatoxicosis. *Toxicol. Lett.* 89, 115–122.
- Ellis, R., Clements, M., Tibbetts, A., and Winfree, R. (2000). Reduction of the bioavailability of 20 µg/kg aflatoxin in trout feed containing clay. *Aquaculture* 183, 179–188.
- Ellis WO, Smith JP, Simpson BK, Oldham JH.(1991). Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Crit Rev Food Sci Nutr* 30:403-39.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem Biophys* 82, 70–77.
- Elshafie, A.E., Al-Rashdi, T.A., Al-Bahry, S.N., and Bakheit, C.S. (2002). Fungi and aflatoxins associated with spices in the Sultanate of Oman. *Mycopathologia* 155, 155–160.
- Ehrlich, K.C. (2009). Predicted roles of the uncharacterized clustered genes in aflatoxin biosynthesis. *Toxins* 1, 37–58.
- Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V., and Reiner, E. (2003). Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal. Biochem.* 312, 224–227.
- Fallah, A.A. (2010). Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food and Chemical Toxicology* 48, 988–991.
- Fallah, A.A., Jafari, T., Fallah, A., and Rahnama, M. (2009). Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1872–1875.
- Fallah, A.A., Rahnama, M., Jafari, T., and Siavash Saei-Dehkordi, S.(2011). Seasonal variation of aflatoxin M1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food control* 22, 1653–1656.

- FAO (2004). Food and Agriculture Organization, Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO, Food and Nutrition Paper N° 81. Rome, Italy.
- FAO/University of Nairobi, National Stakeholders Workshop on Aflatoxin Control along the Maize Value 28-30th September 2011, Nairobi Kenya.
- Fazekas, B., Tar, A., and Kovacs, M. (2005). Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Additives and Contaminants* 22, 856–863.
- Flaherty, J.E., and Payne, G.A. (1997). Overexpression of aflR Leads to Upregulation of Pathway Gene Transcription and Increased Aflatoxin Production in *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3995–4000.
- Flannigan, B., and Hui, S.C. (1976). The Occurrence of Aflatoxin-producing Strains of *Aspergillus flavus* in the Mould Floras of Ground Spices. *Journal of Applied Microbiology* 41, 411–418.
- Fisher, M.C., and Henk, D.A. (2012). Sex, drugs and recombination: the wild life of *Aspergillus*. *Molecular Ecology* 21, 1305–1306.
- Forrester, L.M., Neal, G.E., Judah, D.J., Glancey, M.J., and Wolf, C.R. (1990). Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 8306–8310.
- Fremy JM (1982) Aflatoxines et produits laitiers. *Bull Lab Vét*, 6, 57-64.
- Frisvad, J.C., Skouboe, P., and Samson, R.A. (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 442–453.
- Gallo, A., Moschini, M., and Masoero, F. (2009). Aflatoxins absorption in the gastro-intestinal tract and in the vaginal mucosa in lactating dairy cows. *Italian Journal of Animal Science* 7, 53–64.
- Galtier, P., Loiseau, N., Oswald, I.P., and Puel, O. (2006). Toxicologie des mycotoxines: dangers et risques en alimentation humaine et animale. *Bulletin De l'Académie Vétérinaire De France* 159, 5–13.
- Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A., and Galvano, G. (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J. Food Prot.* 64, 120–131.
- Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Fusconi, G., Galvano, M., Piva, A., and Piva, G. (1996). Reduction of Carryover of Aflatoxin from Cow Feed to Milk by Addition of Activated Carbons. *Journal of Food Protection* 59, 551–554.

- Garon, D., Richard, E., Sage, L., Bouchart, V., Pottier, D., and Lebailly, P. (2006). Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3479–3484.
- Georgiadou, M., Dimou, A., and Yanniotis, S. (2012). Aflatoxin contamination in pistachio nuts: A farm to storage study. *Food Control* 26, 580–586.
- Gerbaldo, G.A., Pereyra, C.M., Cavaglieri, L.R., Ruiz, F., Pascual, L., Dalcero, A.M., and Barberis, I.L. (2011). Surveillance of Aflatoxin and Microbiota Related to Brewer's Grain Destined for Swine Feed in Argentina. *Veterinary Medicine International* 2011, 1–7.
- Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J., and Roberts, T.A. (1994). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiol.* 23, 419–431.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., and Battilani, P. (2007). Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 113, 330–338.
- Gonçalves, S.S., Stchigel, A.M., Cano, J.F., Godoy-Martinez, P.C., Colombo, A.L., and Guarro, J. (2012). *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. *Med. Mycol.* 50, 152–160.
- Gong, Y.Y., Cardwell, K., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P.C., Hall, A.J., and Wild, C.P. (2002). Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study. *BMJ* 325, 20–21.
- Gong, Y., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P.C., Sutcliffe, A.E., Hall, A.J., Cardwell, K., and Wild, C.P. (2004). Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. *Environmental Health Perspectives* 112, 1334–1338.
- Góth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta* 196, 143–151.
- Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J., and Gettinby, G. (1997). Effects of Temperature, Water Activity, and Incubation Time on Production of Aflatoxins and Cyclopiazonic Acid by an Isolate of *Aspergillus flavus* in Surface Agar Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1048–1053.
- Gülçin, I. (2005). The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *Int J Food Sci Nutr* 56, 491–499.

- Hall A.J., Wild C.P.(1994). Epidemiology of aflatoxin-related disease. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance. Ed.: Eaton, D. L., Groopman, J. D. Academic press INC., London, p. 233 -258.
- Hammond, B.G., Campbell, K.W., Pilcher, C.D., DeGooyer, T.A., Robinson, A.E., McMillen, B.L., Spangler, S.M., Riordan, S.G., Rice, L.G., and Richard, J.L. (2004). Lower Fumonisin Mycotoxin Levels in the Grain of Bt Corn Grown in the United States in 2000–2002. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1390–1397.
- Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P., and Denning, D.W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153, 1677–1692.
- Herzallah, S.M. (2009). Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry* 114, 1141–1146.
- Heshmati, A., and Milani, J.M. (2010). Contamination of UHT milk by aflatoxin M1 in Iran. *Food Control* 21, 19–22.
- Holmes, R.A., Boston, R.S., and Payne, G.A. (2008). Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78, 559–572.
- Holmquist, G.U., Walker, H.W., and Stahr, H.M. (1983). Influence of Temperature, pH, Water Activity and Antifungal Agents on Growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Food Science* 48, 778–782.
- Hsieh, D.P.H., Salhab, A.S., Wong, J.J., and Yang, S.L. (1974). Toxicity of aflatoxin Q1 as evaluated with the chicken embryo and bacterial auxotrophs. *Toxicology and Applied Pharmacology* 30, 237–242.
- Huang, J.-Q., Jiang, H.-F., Zhou, Y.-Q., Lei, Y., Wang, S.-Y., and Liao, B.-S. (2009). Ethylene inhibited aflatoxin biosynthesis is due to oxidative stress alleviation and related to glutathione redox state changes in *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology* 130, 17–21.
- Huang, J., Jiang, H., Wang, S., Lei, Y., and Liao, B. (2008). The Metabolic Responses of *Aspergillus flavus* to N-Acetylcysteine, Ascorbate, and H₂O₂. *Agricultural Sciences in China* 7, 74–81.
- Hussein, H.S., and Brasel, J.M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167, 101–134.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., and Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Lett.* 122, 179–188.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (1993). Aflatoxins, Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic

aromatic amines and mycotoxins. IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, IARC, Lyon, France: World Health Organization 56, 245–395.

- IARC, International Agency for Research on Cancer (2002). Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol. 82. World Health Organization, IARC, Lyon, France
- Ibargutxi, M.A., Estela, A., Ferré, J., and Caballero, P. (2006). Use of *Bacillus thuringiensis* toxins for control of the cotton pest *Earias insulana* (Boisd.)(Lepidoptera: Noctuidae). *Applied and Environmental Microbiology* 72, 437–442.
- Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T., and Goto, T. (2001). *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research* 105, 233–239.
- Jaksic, S.M., Abramović, B.F., Prunić, B.Z., Mihaljev, Ž.A., Baloš, M.M.Ž., Jajić, I.M., Despotović, V.N., and Bjelica, L.J.(2011). Incidence of aflatoxins and fumonisins in cereal food from Serbian market. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 17, 108–112
- James, B., C., Cardwell, K., Annang, D., Hell, K., Korie, S., Edoorh, M., Gbeassor, F., Nagatey, K., and Houenou, G.(2007). Public information campaign on aflatoxin contamination of maize grains in markets stores in Benin, Ghana and Togo. *Food Additives and Contaminations* 24, 1283–1291.
- Jayashree, T., and Subramanyam, C. (1999). Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters in Applied Microbiology* 28, 189–193.
- Jayashree, T., and Subramanyam, C. (2000). Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 981–985.
- Jermnak, U., Yoshinari, T., Sugiyama, Y., Tsuyuki, R., Nagasawa, H., and Sakuda, S. (2012). Isolation of methyl syringate as a specific aflatoxin production inhibitor from the essential oil of *Betula alba* and aflatoxin production inhibitory activities of its related compounds. *International Journal of Food Microbiology* 153, 339–344.
- Jiang, Y., Jolly, P.E., Ellis, W.O., Wang, J.S., Phillips, T.D., and Williams, J.H. (2005). Aflatoxin B1 albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians. *International Immunology* 17, 807–814.
- Juan, C., Zinedine, A., Moltó, J.C., Idrissi, L., and Mañes, J. (2008). Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Salé area, Morocco. *Food Control* 19, 849–853.

- Kabak, B., Dobson, A.D.W., and Var, I. [idiot] l (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, 593–619.
- Kensler, T.W., Roebuck, B.D., Wogan, G.N., and Groopman, J.D. (2010). Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology. *Toxicological Sciences* 120, S28–S48.
- Khlangwiset P, Shephard GS, Wu F (2011). Aflatoxins and growth impairment: A review. *Critical Reviews in Toxicology*, submitted.
- Kim, J.H., Campbell, B.C., Mahoney, N.E., Chan, K.L., and Molyneux, R.J. (2004). Identification of phenolics for control of *Aspergillus flavus* using *Saccharomyces cerevisiae* in a model target-gene bioassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7814–7821.
- Kumagai, S. (1989). Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats. *Toxicology. Applied. Pharmacology*. 97, 88–97.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W., and Hesseltine, C.W.(1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*</i>; *Antonie Van Leeuwenhoek* 53, 147–158.
- Lansden, J.A. (1986). Determination of cyclopiazonic acid in peanuts and corn by thin layer chromatography. *J Assoc Off Anal Chem* 69, 964–966.
- Le Bars J., Le Bars P. : Les moisissures de denrées alimentaires et leurs mycotoxines. *Bull. Ass. A.E. Inst. Pasteur Paris*, 1988, 30,8-21.
- Lee, S.-E., Mahoney, N.E., and Campbell, B.C.(2002). Inhibition of aflatoxin B1 biosynthesis by piperlongumine isolated from *Piper longum* L. *Journal of microbiology and biotechnology* 12, 679–682.
- Lemke, S.L., Ottinger, S.E., Mayura, K., Ake, C.L., Pimpukdee, K., Wang, N., and Phillips, T.D. (2001). Development of a multi-tiered approach to the in vitro prescreening of clay-based enterosorbents. *Animal Feed Science and Technology* 93, 17–29.
- Lin, J.Q., Zhao, X.X., Wang, C.C., Xie, Y., Li, G.H., and He, Z.M. (2012). 5-Azacytidine inhibits aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Annals of Microbiology* 1–7.
- Liu, Y., and Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 118, 818–824.
- Lou, J.L., Meng, Z.H., and Wang, D.S. (1994). Production and characterization of sterigmatocystin. *Biomed. Environ. Sci.* 7, 293–301.

- Madhyastha, M.S., and Bhat, R.V. (1984). *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production on black and white pepper and the inhibitory action of their chemical constituents. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 376–379.
- Magan, N. (2006). Mycotoxin contamination of food in Europe: Early detection and prevention strategies. *Mycopathologia* 162, 245–253.
- Mandeel, Q.A. (2005). Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia* 159, 291–298.
- Martins, M.L., Martins, H.M., and Bernardo, F. (2001). Aflatoxins in spices marketed in Portugal. *Food Additives and Contaminants* 18, 315–319.
- Masri, M.S., Haddon, W.F., Lundin, R.E., and Hsieh, D.P.H. (1974). Aflatoxin Q1. Newly identified major metabolite of aflatoxin B1 in monkey liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 22, 512–515.
- McLean, M., and Dutton, M.F. (1995). Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An update. *Pharmacology & Therapeutics* 65, 163–192.
- Mehrzad, J., Klein, G., Kamphues, J., Wolf, P., Grabowski, N., and Schuberth, H.J. (2011). In vitro effects of very low levels of aflatoxin B1 on free radicals production and bactericidal activity of bovine blood neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 141, 16–25.
- Meyer, A., Deiana, J., and Bernard, A. (2004). *Cours de microbiologie générale: avec problèmes et exercices corrigés* (Wolters Kluwer France).
- Meyers, D.M., Obrian, G., Du, W.L., Bhatnagar, D., and Payne, G.A. (1998). Characterization of aflJ, a gene required for conversion of pathway intermediates to aflatoxin. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3713–3717.
- Miedaner, T., Löffler, M., Bolduan, C., Kessel, B., Ouzunova, M., Mirdita, V., and Melchinger, A.E. (2008). Genetic variation for resistance and mycotoxin content of European maize inoculated with *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides*. *Cereal Research Communications* 36, 45–48.
- Mishra, H.N., and Das, C. (2003). A Review on Biological Control and Metabolism of Aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43, 245–264.
- Molina, M., and Giannuzzi, L. (2002). Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. *Food Research International* 35, 585–594.
- Motawee, M.M., Bauer, J., and McMahon, D.J. (2009). Survey of Aflatoxin M 1 in Cow, Goat, Buffalo and Camel Milks in Ismailia-Egypt. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83, 766–769.

- Mousa, W., Ghazali, F.M., Jinap, S., Ghazali, H.M., and Radu, S. (2011). Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. *Journal of Applied Microbiology* 111, 1262–1274.
- Narasaiah, K.V., Sashidhar, R.B., and Subramanyam, C. (2006). Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathologia* 162, 179–189.
- Ngindu, A., Kenya, P., Ocheng, D., Omondi, T., Ngare, W., Gatei, D., Johnson, B., Ngira, J., Nandwa, H., Jansen, A., et al. (1982). OUTBREAK OF ACUTE HEPATITIS CAUSED BY AFLATOXIN POISONING IN KENYA. *The Lancet* 319, 1346–1348.
- Norton, R.A. (1997). Effect of Carotenoids on Aflatoxin B1 Synthesis by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 87, 814–821.
- Ok, H.E., Kim, H.J., Shim, W.B., Lee, H., Bae, D.-H., Chung, D.-H., and Chun, H.S. (2007). Natural occurrence of aflatoxin B1 in marketed foods and risk estimates of dietary exposure in Koreans. *J. Food Prot.* 70, 2824–2828.
- Olarte, R.A., Horn, B.W., Dorner, J.W., Monacell, J.T., Singh, R., Stone, E.A., and Carbone, I. (2012). Effect of sexual recombination on population diversity in aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and evidence for cryptic heterokaryosis. *Molecular Ecology* 21, 1453–1476.
- Olufunmilayo, G.O., and Oyefolu, A.B. (2010). Natural occurrence of aflatoxin residues in fresh and sun-dried meat in Nigeria. *Pan African Medical Journal* 7, 14.
- Omer R.E., Kuijsten A., Kadaru A.M., Kok F.J., Idris M.O., EL K, I, Van V.(2004).Population-attributable risk of dietary aflatoxins and hepatitis B virus infection with respect to hepatocellular carcinoma. *Nutr.Cancer*, 48, 15-21.
- O’ Riordan, M.J., and Wilkinson, M.G. (2008). A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of imported spice preparations on the Irish retail market. *Food Chemistry* 107, 1429–1435.
- Ottinger, C.A., and Kaattari, S.L. (2000). Long-term immune dysfunction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed as embryos to aflatoxin B1. *Fish & Shellfish Immunology* 10, 101–106.
- Ozbey, F., and Kabak, B. (2012). Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control* 28, 354–361.
- Papa, K.E. (1982). Norsolorinic Acid Mutant of *Aspergillus flavus*. *J Gen Microbiol* 128, 1345–1348.

- Park, J.W., Choi, S.Y., Hwang, H.J., and Kim, Y.B. (2005). Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *International Journal of Food Microbiology* 103, 305–314
- Park, D.L., Trucksess, M.W., Nesheim, S., Stack, M., and Newell, R.F. (1994). Solvent-efficient thin-layer chromatographic method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in corn and peanut products: collaborative study. *J AOAC Int* 77, 637–646.
- Peng, K.-Y., and Chen, C.-Y. (2009). Prevalence of aflatoxin M1 in milk and its potential liver cancer risk in Taiwan. *Journal of Food Protection*. 72, 1025–1029.
- Pereyra, C. m., Cavaglieri, L. r., Chiacchiera, S. m., and Dalcero, A. (2013). The corn influence on the adsorption levels of aflatoxin B1 and zearalenone by yeast cell wall. *Journal of Applied Microbiology*.
- Peterson, S. W., Ito, Y., Horn, B. W. & Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93, 689–703.
- Pfohl-Leszkowicz, A. (1999). Définition et origines des mycotoxines. Dans « Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque » de Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. Technique et Documentation, Paris.
- Pfohl-Leszkowicz A.(2001),Définition et origines des mycotoxies in *Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque*, Ed. Tec & Doc, 3-14.
- Pier, A.C. (1992). Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *Journal of Animal Science* 70, 3964–3967.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., and Piva, G. (2004). Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Addit Contam* 21, 479–487.
- Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., and Samson, R.A. (2008).Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology* 58, 725–735.
- Piva, G., Galvano, F., Pietri, A., and Piva, A. (1995). Detoxification methods of aflatoxins. A review. *Nutrition Research* 15, 767–776.
- Plan Ecophyto 2018 : De réduction des usages de pesticides 2008-2018.
- Pôle technologique agro-alimentaire asbl (2004) Newsletter N° 3 :12.

- Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., and Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology* 47, 984–991.
- Price, M.S., Yu, J., Nierman, W.C., Kim, H.S., Pritchard, B., Jacobus, C.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., and Payne, G.A. (2006). The aflatoxin pathway regulator AflR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiology Letters* 255, 275–279.
- Probst, C., Njapau, H., and Cotty, P.J. (2007). Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2762–2764.
- Probst, C., Schulthess, F., and Cotty, P.J. (2010). Impact of *Aspergillus section Flavi* community structure on the development of lethal levels of aflatoxins in Kenyan maize (*Zea mays*). *Journal of Applied Microbiology* 108, 600–610.
- Ra, D., and Ma, G. (1996). Immunosuppressant activity of aflatoxin ingestion in rabbits measured by response to *Mycobacterium bovis* antigen I. Cell mediated immune response measured by skin test reaction. *Veterinary and Human Toxicology* 38, 333–336
- Ramirez-Prado, J.H., Moore, G.G., Horn, B.W., and Carbone, I. (2008). Characterization and population analysis of the mating-type genes in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics and Biology* 45, 1292–1299.
- Ramos, A.-J., Fink-Gremmels, J., and Hernández, E. (1996). Prevention of Toxic Effects of Mycotoxins by Means of Nonnutritive Adsorbent Compounds. *Journal of Food Protection* 59, 631–641.
- Rao, S.B.N., and Chopra, R.C. (2001). Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M1 excretion in milk of goats. *Small Ruminant Research* 41, 203–213.
- Rank, C., Nielsen, K.F., Larsen, T.O., Varga, J., Samson, R.A., and Frisvad, J.C. (2011). Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology* 115, 406–420.
- Raper K.B et Fennell D.I. (1965). The genus *Aspergillus*, the Williams & Wilkins Company, Baltimore. Maryland.
- Razzaghi-Abyaneh, M.; Yoshinari, T.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Rezaee, M. B.; Nagasawa, H. & Sakuda, S. (2007). Dillapiol and apiol as specific inhibitors of the

biosynthesis of aflatoxin G1 in *Aspergillus parasiticus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71,2329-2332.

- Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A., and Sabaou, N. (2010). *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2772–2777.
- Richard JL (1998) *Mycotoxins, Toxicity and Metabolism in Animals-Asystem Approach Overview. Mycotoxins and Phycotoxins-Developpements in Chemistry, Toxicology and Food Safety*, Ed by M. Miraglia, H. van Egmond, C. Brera, and J. Gilbert. USA: 363- 397.
- Riley, R.T., and Norred, W.P.(1999). Mycotoxin prevention and decontamination : a case study on maize. In *Food, Nutrition and Agriculture*, (Food and Agriculture Organization), pp. 25–32.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., and Lima, N. (2012). Aflatoxigenic Fungi and Aflatoxins in Portuguese Almonds. *The Scientific World Journal* 2012, 1–9.
- Ruangwises, N., and Ruangwises, S. (2010). Aflatoxin M 1 contamination in raw milk within the central region of Thailand. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 85, 195–198.
- Rumora, L., Domijan, A.-M., Grubisić, T.Z., and Peraica, M. (2007). Mycotoxin fumonisin B1 alters cellular redox balance and signalling pathways in rat liver and kidney. *Toxicology* 242, 31–38.
- Rustom, I.Y.S. (1997). Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry* 59, 57–67.
- Salem, M.H., Kamel, K.I., Yousef, M.I., Hassan, G.A., and El-Nouty, F.D. (2001). Protective role of ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B 1. *Toxicology* 162, 209–218.
- Sahoo, P.K., and Mukherjee, S.C. (2001). Immunosuppressive effects of aflatoxin B1 in Indian major carp (*Labeo rohita*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 24, 143–149.
- Sahoo, P., and Mukherjee, S.. (2003). Immunomodulation by dietary vitamin C in healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 26, 65–76.

- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B. (2010). Food and Indoor Fungi. CBS Laboratory Manual Series, CBS Knaw, Fungal biodiversity center, Utrecht, Netherland, 390 p.
- Sangare-Tigori, B., Moukha, S., Kouadio, H.J., Betbeder, A.M., Dano, D.S., and Creppy, E.E. (2006). Co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1, ochratoxin A and zearalenone in cereals and peanuts from Côte d'Ivoire. Food Additives and Contaminants 23, 1000–1007.
- Sarr, A.B., Mayura, K., Kubena, L.F., Harvey, R.B., and Phillips, T.D. (1995). Effects of phyllosilicate clay on the metabolic profile of aflatoxin B1 in Fischer-344 rats. Toxicol. Lett. 75, 145–151.
- Shephard, G.S. (2008). Risk assessment of aflatoxins in food in Africa. Food Additives and Contaminants 25, 1246–1256.
- Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N., and Geisen, R. (2009). Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. International Journal of Food Microbiology 135, 231–237.
- Schroeder, H.W. (1966). Effect of Corn Steep Liquor on Mycelial Growth and Aflatoxin Production in *Aspergillus parasiticus*. Appl. Microbiol. 14, 381–385.
- Schroeder, H.W., and Hein, H. (1967). Aflatoxins: production of the toxins in vitro in relation to temperature. Applied Microbiology 15, 441–445.
- Shundo, L., De Almeida, A.P., Alaburda, J., Lamardo, L.C.A., Navas, S.A., Ruvieri, V., and Sabino, M. (2009a). Aflatoxins and ochratoxin A in Brazilian paprika. Food Control 20, 1099–1102.
- Shundo, L., Navas, S.A., Lamardo, L.C.A., Ruvieri, V., and Sabino, M. (2009b). Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. Food Control 20, 655–657.
- Snijders, C.H.A. (2004). Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichothecene formation. Toxicology Letters 153, 37–46.
- Soares, C., Rodrigues, P., Peterson, S.W., Lima, N., and Venancio, A. (2011). Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. Mycologia 104, 682–697.
- Stoloff, L. (1980). Aflatoxin M in Perspective. Journal of Food Protection 34, 226–230.

- Stoloff, L., Verrett, M.J., Dantzman, J., and Reynaldo, E.F. (1972). Toxicological study of aflatoxin P1 using the fertile chicken egg. *Toxicology and Applied Pharmacology* 23, 528–531.
- Sun, Y., Oberley, L.W., and Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* 34, 497–500.
- Tabuc, C., Marin, D., Guerre, P., Sesan, T., and Bailly, J.D. (2009). Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania. *J. Food Prot.* 72, 662–665.
- Tabuc, C., Taranu, I., and Calin, L. (2011). Survey of moulds and mycotoxin contamination of cereals in South-Eastern Romania in 2008-2010. *Archiva Zootechnica* 14, 25–38.
- Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., and Fleet, G.H. (2009). Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 132, 100–108.
- Tavakoli, H.R., Riazipour, M., Kamkar, A., Shaldehi, H.R., and Mozaffari Nejad, A.S. (2012). Occurrence of aflatoxin M1 in white cheese samples from Tehran, Iran. *Food Control* 23, 293–295.
- Theumer, M.G., López, A.G., Masih, D.T., Chulze, S.N., and Rubinstein, H.R. (2003). Immunobiological effects of AFB1 and AFB1–FB1 mixture in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. *Toxicology* 186, 159–170.
- Tomašević-Čanović, M., Daković, A., Rottinghaus, G., Matijašević, S., and Đuričić, M. (2003). Surfactant modified zeolites--new efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous and Mesoporous Materials* 61, 173–180.
- Trail, F., Mahanti, N., Rarick, M., Mehig, R., Liang, S.H., Zhou, R., and Linz, J.E. (1995). Physical and transcriptional map of an aflatoxin gene cluster in *Aspergillus parasiticus* and functional disruption of a gene involved early in the aflatoxin pathway. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2665–2673.
- Trail, F., Chang, P.K., Cary, J., and Linz, J.E. (1994). Structural and functional analysis of the nor-1 gene involved in the biosynthesis of aflatoxins by *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* 60, 4078–4085.
- Unusan, N. (2006). Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 44, 1897–1900.
- Vainio H., Magee P., Mcgregor D., Mcmichael A. (1992). Mechanisms of Carcinogens in Risk Identification, IARC Scientific Publications No 116, IARC, Lyon.

- Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., and Jonker, M.A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 147–157.
- Van Eijkeren, J.C.H., Bakker, M.I., and Zeilmaier, M.J. (2006). A simple steady-state model for carry-over of aflatoxins from feed to cow's milk. *Food Additives and Contaminants* 23, 833–838.
- Varga, J., Frisvad, J., and Samson, R. (2009). A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin Journal* 2, 263–277.
- Varga, J., Frisvad, J.C., and Samson, R.A. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *SIM* 69, 57–80.
- Vesely D., Vesela D., Jelinek R.(1983) Comparative assessment of the aflatoxin B1, B2, G1, G2 and M1 embryotoxicity in the chick embryo. *Toxico. Letters*, 1983, 15, 297-302.
- Villa, P., and Markaki, P. (2009). Aflatoxin B1 and ochratoxin A in breakfast cereals from athens market: Occurrence and risk assessment. *Food Control* 20, 455–461.
- Wang, P., Afriyie-Gyawu, E., Tang, Y., Johnson, N.M., Xu, L., Tang, L., Huebner, H.J., Ankrah, N.-A., Ofori-Adjei, D., Ellis, W., et al. (2008). NovaSil clay intervention in Ghanaians at high risk for aflatoxicosis: II. Reduction in biomarkers of aflatoxin exposure in blood and urine. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 25, 622–634.
- Wilkinson, J.R., Kale, S.P., Bhatnagar, D., Yu, J., and Ehrlich, K.C. (2011). Expression profiling of non-aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* mutants obtained by 5-azacytosine treatment or serial mycelial transfer. *Toxins* 3, 932–948.
- Wild, C.P., and Gong, Y.Y. (2010). Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Oxford journals life science and medicine, Carcinogenesis* 31, 71–82.
- Wild, C.P., Hall, A.J., Howard, D.H., and Miller, J.D. (1996). Epidemiology of mycotoxin-related disease. 213–227.
- Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., and Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80, 1106–1122.
- Wogan, G.N. (1966). Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriological Reviews* 30, 461.

- Wolzak, A., Pearson, A.M., Coleman, T.H., Pestka, J.J., and Gray, J.I. (1985). Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. *Food Chem. Toxicol.* 23, 1057–1061.
- Zain, M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 15, 129–144.
- Zheng, N., Sun, P., Wang, J.Q., Zhen, Y.P., Han, R.W., and Xu, X.M. (2013). Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and pasteurized milk in China market. *Food Control* 29, 198–201.
- Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faid, M., Benlemlih, M., Minardi, V., et al. (2006). Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control* 17, 868–874.
- Yabe, K., and Nakajima, H. (2004). Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 745–755.
- Yiannikouris, A., André, G., Poughon, L., Francois, J., Dussap, C.G., Jeminet, G., Bertin, G., and Jouany, J.P. (2006). Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with β -D-glucans. *Biomacromolecules* 7, 1147–1155.
- Yoshinari, T., Yaguchi, A., Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Takahashi, H., Nakajima, T., Sugita-Konishi, Y., Nagasawa, H., and Sakuda, S. (2008). Spiroethers of German chamomile inhibit production of aflatoxin G1 and trichothecene mycotoxin by inhibiting cytochrome P450 monooxygenases involved in their biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* 284, 184–190.
- Yoshinari, T., Akiyama, T., Nakamura, K., Kondo, T., Takahashi, Y., Muraoka, Y., Nonomura, Y., Nagasawa, H., and Sakuda, S. (2007). Diocatin A is a strong inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 153, 2774–2780.
- Yu, J. (2012). Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *toxins* 4, 1024–1057.
- Yu, J., Bhatnagar, D., and Cleveland, T.E. (2004a). Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *FEBS Letters* 564, 126–130.
- Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P., and Bennett, J.W. (2004b). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1253–1262.
- Yu, J., Chang, P.-K., Payne, G.A., Cary, J.W., Bhatnagar, D., and Cleveland, T.E. (1995). Comparison of the omtA genes encoding O-methyltransferases involved

in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus parasiticus* and *A. flavus*. *Gene* 163, 121–125.

- Yu, J., and Ehrlich, K.C. (2011). Aflatoxin biosynthetic pathway and pathway genes. *Intech* 41–66.
- Yu, J., Fedorova, N.D., Montalbano, B.G., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Bennett, J.W., and Nierman, W.C. (2011). Tight control of mycotoxin biosynthesis gene expression in *Aspergillus flavus* by temperature as revealed by RNA-Seq. *FEMS Microbiology Letters* 322, 145–149.
- Yuen, G.Y., and Schoneweis, S.D. (2007). Strategies for managing *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *International Journal of Food Microbiology* 119, 126–130.

26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI Direct 0820 210 211

Pour déposer par télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)

Vos références pour ce dossier	26555 FR/EF
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	
TITRE DE L'INVENTION	
Titre	COMPOSITION POUR INHIBER LA PRODUCTION D'UNE MYCOTOXINE PAR UNE ESPÈCE FONGIQUE ET SON UTILISATION POUR LE TRAITEMENT D'UNE MATIÈRE VÉGÉTALE
LE(S) DEMANDEUR(S)	INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE
DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S)	
INVENTEUR 1	
Nom	BAILLY
Prénom	Jean-Denis
Rue	17, Chemin Marial
Code postal et ville	31470 FONSORBES
Pays	FR
INVENTEUR 2	
Nom	PUEL
Prénom	Olivier
Rue	20, Rue de Donezan
Code postal et ville	31490 LEGUEVIN
Pays	FR
INVENTEUR 3	
Nom	OSWALD
Prénom	Isabelle
Rue	48, Bis Rue de Metz
Code postal et ville	31000 TOULOUSE
Pays	FR
INVENTEUR 4	
Nom	BAILLY

Prénom	Sylviane
Rue	17, Chemin Marial
Code postal et ville	31470 FONSORBES
Pays	FR
INVENTEUR 5	
Nom	EL MAHGUBI
Prénom	Anwar
Rue	13 B. Rue Berthy Albrecht
Code postal et ville	31300 TOULOUSE
Pays	FR
DATE ET SIGNATURE	
Signé numériquement par	Subject: FR, CABINET SCHMIT-CHRETIEN, Emmanuelle FOURCADE; Issuer: FR, INPI, INPI-EN-LIGNE 1.1
Date	20 December 2012
Signataire	Mandataire

Conformément aux dispositions de la loi n° 78-17 du 6.01.1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous bénéficiez d'un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI. Les données à caractère personnel que vous êtes tenu(e) de nous fournir dans ce formulaire sont exclusivement utilisées pour identifier le titulaire de la demande et son éventuel mandataire.